

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 5 月 2 日 (02.05.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/34912 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/12, C07K 14/47, C12Q
1/68, G01N 33/50, A61K 38/17, 48/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/09313

(22) 国際出願日: 2001 年 10 月 24 日 (24.10.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2000-324296

2000 年 10 月 24 日 (24.10.2000) JP

特願 2001-90546 2001 年 3 月 27 日 (27.03.2001) JP

特願 2001-99990 2001 年 3 月 30 日 (30.03.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人
新産業創造研究機構 (THE NEW INDUSTRY RE-
SEARCH ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒650-0047 兵庫
県神戸市中央区港島南町1丁目5-2 Hyogo (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 塩澤俊一 (SHIOZAWA, Shunichi) [JP/JP]; 〒
651-2274 兵庫県神戸市西区竹の台2丁目11-6 Hyogo
(JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小西良武 (KON-
ISHI, Yoshitake) [JP/JP]; 〒654-0121 兵庫県神戸市須
磨区妙法寺字ぬめり石 337-1A303 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 原 謙三 (HARA, Kenzo); 〒530-0041 大阪府
大阪市北区天神橋2丁目北2番6号 大和南森町ビル 原
謙三国際特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,

[続葉有])

(54) Title: GENOMES PARTICIPATING IN RHEUMATOID ARTHRITIS, METHOD OF THE DIAGNOSIS THEREOF,
METHOD OF EVALUATING THE ONSET POSSIBILITY THEREOF, DIAGNOSTIC KIT FOR DETECTING THEM AND
THERAPEUTIC METHOD AND REMEDIES FOR RHEUMATOID ARTHRITIS

(54) 発明の名称: 慢性関節リウマチに関与するゲノム、その診断方法、その発症可能性の判定方法、それらの検出
用診断キットおよび、慢性関節リウマチの治療方法ならびに治療薬剤

(57) Abstract: A mutation in genomes participating in rheumatoid arthritis (RA) is found out in human DR3 genomic DNA having
the base sequence represented by SEQ ID NO:1. Genomes having the above mutation, transcriptional products thereof, a method of
highly accurately determining the RA onset possibility by using the mutation thereof, a determination kit therefor, and a therapeutic
method and remedies for RA are provided.

(57) 要約:

本発明者らは、配列番号 1 に塩基配列が示されるヒト DR3 のゲノム

DNA において、慢性関節リウマチ (RA) に関与するゲノムの変異を

見出した。本発明は、かかる変異を有するゲノム、それらの転写産物、

それらの変異を利用して RA の発症またはその発症可能性を高精度に判

定する方法、その判定用キット、さらには、RA の治療方法および治療

薬剤を提供するものである。

WO 02/34912 A1



AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明 細 書

慢性関節リウマチに關与するゲノム、その診断方法、その発症可能性の判定方法、それらの検出用診断キットおよび、慢性関節リウマチの治療方法ならびに治療薬剤

5 技術分野

本発明は、変異を有するゲノム、それらの転写産物およびそれらの変異を利用したヒト慢性関節リウマチの診断方法、その発症可能性の判定方法およびそれらの検出用の診断キットに關し、さらに、当該リウマチの治療方法およびその治療薬剤に關するものである。

10

背景技術

15

慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis。以下「RA」ともいう) は、多発するびらん性関節炎を主徴とするが、同時に多臓器を障害する原因不明の全身性炎症疾患である。RAは寛解と増悪とを繰り返しながら慢性に進行し、無治療で放置すると関節の破壊や変形を来し、やがて運動器の機能障害を呈してくる。時には生命をも脅かす。したがって、RA患者は身体的にも精神的にも大きな苦痛を生涯に亘って背負うことになる。

20

RAは、その発症の仕方も多種多様であり、その診断には、アメリカリウマチ学会の診断基準が広く利用されている。しかしながら、RAの発症は、通常、緩徐で数週間から数ヶ月にわたり、アメリカリウマチ学会の診断基準における客観的な指標としてのリウマトイド因子の存在

は、その陽性率が 3 ヶ月以内に 33%、12 ヶ月以上においても 88% 程度（治療、第 73 巻、第 3 号、第 23～27 頁、1991 年）であり、RA と確実に診断するには至っていない。そこで、組換え抗原と反応する患者血清中のリウマチ性関節炎関連抗体 IgM 抗体を検出し、リウマチ性関節炎を診断しようとする試みなどがなされている（特開平 10-513257 号参照）。

また、RA の治療は、RA 病態の病状の進行過程によって選択すべき治療手段は異なるのが通常である。一般的に確定診断が下せない初期では、非ステロイド抗炎症薬（NSAID）を投与し、確定診断が下せた場合は、NSAID に加えて疾患修飾性リウマチ薬（DMARD）を投与する。特に RA 発症の初期には、確定診断を下すことは困難であり、現状では、NSAID を投与し、経過を慎重に観察しながら膠原病を含む他のリウマチ疾患との鑑別を同時に行っている。さらに症状が進行した場合は、ステロイド薬の投与を行う場合もあり、疼痛のための薬物療法と共に関節機能の維持・回復に対して理学療法・装具療法を行う。また、関節破壊により日常生活が不自由になった場合には、手術療法を行う場合もある。

RA の原因である関節炎と関節破壊の様相、特にそれらの病理過程は、種々の研究を通じて次第に明らかになりつつあるが、RA は生活環境を含めた多数の原因因子が重なり合ってはじめて疾患へと発展・憎悪する疾患である。そのため、疾患の正しい解明と適切な治療とを行うには、多因子相互作用の本体そのものが明らかにされなければならない。

RA は、世界的には罹患率 1% 以下の疾患であるが（ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン（N. Engl. J. Med.）、第 322 巻、

第 1277～1289 頁、1990 年)、患者の同胞では約 8 % 以上が発症する
(セル (Cell)、第 85 巻、第 311～318 頁、1996 年) ことから、その
原因因子として何らかの遺伝的要因が想定されている。また、環境が原
因因子の 1 つと考えられていることから、あらかじめ発症可能性を知る
5 ことにより、日常生活において、例えば、食餌、ウイルス感染およびス
トレス等に注意することにより発症を遅らせたり防ぐことが可能である。
さらに、診断を早め、早期に適切な治療を行うことによって R A の進行
を遅らせることが可能であり、予後の改善が期待される。

R A は、その直接の原因の一つとして、アポトーシスの過剰の抑制が
10 ある。これに関して、以下のような報告がある。R A 患者の滑膜細胞は、
in vitro において抗 Fas 抗体によりアポトーシスが誘導される (アー
スリティス・アンド・リウマチズム (Arthritis rheum.)、38 巻、
第 485～491 頁、1995 年)。また、R A のモデル動物であるヒト I 型 T
細胞白血病ウイルス (HTLV-I) tax トランスジェニックマウスに抗 Fas
15 抗体を投与すると、関節の浮腫および関節炎が抑制され (ジャーナル・
オブ・クリニカル・インベスティゲーション (J.Clin. Invest.)、98
巻、第 271～278 頁、1996 年)、さらに SCID マウスの背部に移植され
た R A の滑膜組織は抗 Fas 抗体の投与により消失するとの報告がある
(アースリティス・アンド・リウマチズム (Arthritis rheum.)、41
20 巻、第 1251～1257 頁、1998 年)。

国際公開 W098/51791 号には、本願発明者らが、マイクロサテライト
マーカーを用いた連鎖解析を R A 患者およびその血縁者に対して実施す
ることにより、慢性関節リウマチの疾患遺伝子が位置する 3 カ所の遺伝
子座を特定し、以下の疾患遺伝子を同定している。

(1) ヒト第 1 染色体の、マイクロサテライトマーカーD1S214 および／または D1S253 がハイブリダイズするDNA配列から±1 センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

(2) ヒト第 8 染色体の、マイクロサテライトマーカーD8S556 がハイブリダイズするDNA配列から±1 センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

(3) ヒト X 染色体の、マイクロサテライトマーカーDXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227 および／または DXS1232 がハイブリダイズするDNA配列から±1 センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

また、リウマチ、第 39 号、第 2 号、第 444 頁および第 445 頁には、本願発明者らが、前記先願発明の各疾患遺伝子について、前記 (1) の疾患遺伝子に関係するマーカーD1S214 および D1S253 の疾患遺伝子として、デスレセプター 3 (death receptor 3: 以下「DR3」ともいう) を挙げ、健常人とRA患者との間にDR3の制限断片長多型を確認し、DR3がRAにおける疾患感受性遺伝子である可能性を示唆している。

本発明は、ヒトDR3におけるゲノムの変異とRAの発症またはその発症可能性との関係を解明し、その変異を利用してRAの発症またはその発症可能性を高精度に診断することのできる方法を提供することを課題としている。また、本発明は、RAに関するDR3の変異したゲノムまたはそれらの変異した転写産物を検出するための有用な診断キットを提供するものであり、さらには、DR3に変異を持つRA患者に対する有効な治療方法および治療薬剤を提供するものである。

発明の開示

このような状況下において、本願発明者らは鋭意研究を行った結果、被験者から得られた細胞において、DR3の配列番号1のゲノムに下記の変異を有するゲノムを見出した。

- 5 (1) 位置 921 の塩基がシトシン (C) からチミン (T) への置換
- (2) 位置 1755 の塩基がアデニン (A) からグアニン (G) への置換
- (3) 位置 2443~2456 の塩基の欠損
- (4) 位置 2531 の塩基がシトシン (C) からチミン (T) への置換
- (5) 位置 2678 の塩基がアデニン (A) からチミン (T) への置換
- 10 (6) 位置 2826 の塩基がアデニン (A) からグアニン (G) への置換

また、位置 1755 の塩基は、DR3ゲノムのエクソン領域内にあり、配列番号3にアミノ酸配列が示されるDR3タンパク質においては、位置159のアミノ酸のアスパラギン酸からグリシンへの変異を意味する。一方、上記(1)および(3)~(6)の変異は、DR3ゲノムのイントロン領域にある。

RAの発症に関与するゲノムは従来から複数存在することが知られているが、本発明の変異したゲノムは、これらのRA発症原因の一部を構成するものである。

これらの知見より、被験者から得られた細胞におけるDR3の変異したゲノムおよびその転写産物を指標としたRAの発症またはその発症可能性の判定方法（換言すれば、RAの診断方法）、およびこれらの変異を検出する診断キットが有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。さらに、本発明は、慢性関節リウマチの新たな予防法、治療法および治療薬剤としても有用である。以下、本発明について詳述する。

本明細書において、特に断らない限り、A、C、GおよびTは、アデニン、シトシン、グアニンおよびチミンの各塩基を示す。また、アミノ酸およびアミノ酸残基は、IUPACおよびIUBの定める1文字表記または3文字表記を使用する。また、転写産物とは、ゲノムが転写および翻訳される結果生じる産物であり、たとえば、mRNA、cDNAおよびタンパク質などが挙げられる。

また、位置 1755 の塩基は、cDNAとしてジーンバンクに登録されている配列（アクセッション番号 NM_003790）の 564 番目の塩基に相当する。このゲノムDNAのエクソン5の3'末端の塩基を基準とし、一塩基後のイントロンの塩基を1番目とすると位置 2443~2456 の欠損は、エクソン5の3'末端から 622~635 番目の塩基の欠損に相当する。また、エクソン6の5'末端の塩基を基準とし、一塩基前のイントロンの塩基、番号を-1番目とすると、位置 2531 の変異は、-538 番目、位置 2678 の変異は-391 番目、位置 2826 の変異は-243 番目の塩基に相当する（図1参照）。なお、Tが 28 塩基連続する領域（位置 2443~2470）においては、その数が3塩基分増減する可能性があり、変異型ゲノムのTが 14 塩基連続する領域も同様にしてその数が3塩基分増減する可能性がある。

本発明に係るRAの発症またはその発症可能性の判定方法（換言すれば、RAの診断方法）および判定キット（換言すれば、RAの診断キット）において、ゲノムおよびその転写産物、たとえば、mRNA、cDNAなどが利用でき、たとえば、mRNAは、必要に応じてcDNAに変換して利用することもできる。これらのゲノムは、たとえば、RAの発症またはその発症可能性の判定用のプローブとしても有用である。さらに、たとえば、これらの変異を1つ以上含むゲノム断片も同様にプロ

ープとして有用である。

また、ゲノムから発現されるタンパク質などの転写産物についても変異を検出することができる。これらのゲノムの転写産物についてもRAの発症またはその発症可能性の判定用の試薬またはそれらの原料として有用である。

(a) ゲノムの利用

本発明において、ゲノムを利用する場合、変異ゲノムの同定、およびRAの診断（即ち、RAの発症またはその発症可能性の判定）は、たとえば、以下のようにして実施できる。

被験者のゲノムは、常法により人体の全ての細胞より得ることが可能であるが、たとえば、毛髪、各臓器、末梢リンパ球、滑膜細胞などから得ることができる。また、得られた細胞を培養し、増殖したものから得ることもできる。さらに、得られたゲノムは、例えば、PCR（Polymerase Chain Reaction）法、NASBA（Nucleic acid sequence based amplification）法、TMA（Transcription-mediated amplification）法およびSDA（Strand Displacement Amplification）法などの通常行われる遺伝子増幅法により増幅して使用することができる。

ゲノムの変異の検出方法としては、たとえば、特に限定されないが、アリルト異的オリゴヌクレオチドプローブ法、オリゴヌクレオチドライゲーシオンアッセイ（Oligonucleotide Ligation Assay）法、PCR-SSCP法、PCR-CFLP法、PCR-PHFA法、インベーター法、RCA（Rolling Circle Amplification）法、プライマーオリゴベースエクステンション（Primer Oligo Base Extension）法などが挙げ

られる。

配列番号 1 の位置 21～4825 の塩基配列は、たとえば、以下のプライマーの組み合わせ（1～3）によりゲノムから増幅される P C R 産物のダイレクトシーケンスにより決定できる。尚、配列番号 1 の位置 1～
5 20 の塩基配列は、c D N A としてジーンバンクに登録されている配列（アクセッション番号 NM_003790）である。

1：配列番号 1 の位置 21～38 のセンスプライマーと配列番号 1 の位置 1517～1535 のアンチセンスプライマー。

2：配列番号 1 の位置 1051～1078 のセンスプライマーと配列番号 1 の
10 位置 4058～4085 のアンチセンスプライマー。

3：配列番号 1 の位置 4023～4043 のセンスプライマーと配列番号 1 の位置 4809～4825 のアンチセンスプライマー。

本発明で利用される変異は、配列番号 1 の位置 1755 の塩基の A から G への置換、配列番号 1 の位置 2531 の塩基の C から T への置換、配列
15 番号 1 の位置 2678 の塩基配列の A から T への置換、配列番号 1 の位置 2826 の塩基の A から G への置換は、配列番号 1 の位置 1051～1078 のセンスプライマーと配列番号 1 の位置 4058～4085 のアンチセンスプライマーにより増幅される P C R 産物のダイレクトシーケンスにより検出でき、さらに配列番号 1 の位置 2443～2456 の塩基の欠損が検出できる。
20 言い換えれば、上記した 5 つの塩基の変異が同時に生じている場合、上記 P C R 産物により同時に検出できる。

また、配列番号 1 の位置 921 の塩基 C から T への置換は、配列番号 1 の位置 21～38 のセンスプライマーと配列番号 1 の位置 1517～1535 のアンチセンスプライマーとにより増幅される P C R 産物のシーケンスに

より検出することができる。

つまり、上記変異の検出は、変異を含んだ領域に対するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを作製し、ゲノムから増幅されるPCR産物をダイレクトシーケンスすることにより検出できる。配列番号1のゲノムの1つ以上の上記変異を検出することにより、被験者のRAの診断（発症またはその発症可能性の判定）を高精度に行うことができる。

本発明で使用されるプライマーは、常法により、DNAシンセサイザーなどにより作製することができる。

また、これらの変異は、適当な制限酵素を使用し、切断されるゲノム断片のサイズの違いをサザンブロッティングなどで検出することによっても検出することができる。

上記の変異のうち、配列番号1の位置2443～2456の塩基の欠損は、PCR産物をプラスミドにサブクローニングし、これをシーケンスすることによっても検出できるし、配列番号1の位置2369～2389のセンスプライマーと配列番号1の位置2514～2535のアンチセンスプライマーとにより増幅されるPCR産物のサイズの相違によっても検出できる。

（b）転写産物の利用

本発明において、ゲノムの変異により、変化を生じるmRNA、タンパク質などの転写産物を検出することによっても被験者のRAの診断（発症またはその発症可能性の判定）を高精度に行うことができる。

たとえば、転写産物としてmRNAを利用する場合、変異の部分を含む配列、たとえば、配列番号1の位置1534～3306を発現ベクターに組み換え、細胞にトランスフェクションし、ベクター由来のmRNAを比

較する方法及びmRNAからcDNAを作製し、cDNAをシークエンスする方法などによって変異を検出できる。

具体的には、配列番号1の位置1755の塩基のAからGへの置換、配列番号1の位置2443～2456の塩基の欠損、配列番号1の位置2531の塩基のCからTへの置換、配列番号1の位置2678の塩基のAからTへの置換、配列番号1の位置2826の塩基のAからGへの変異を有するベクターにおいて、配列番号1の位置2636～2792が保持されたmRNAが検出される。このmRNAの塩基配列の一部は、配列番号4であり、イントロンの挿入によりフレームシフトが生じ、これが原因でアミノ酸残基の変異および終止コドンが出現する。また、このmRNAから発現されるタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号5に示される。

また、たとえば、配列番号1の位置1534～3306を発現ベクターに組み換えたベクター、組み換えたベクターで配列番号1の位置1755に相当する部分にAからGの変異を導入したもの、配列番号1の位置2531にCからTの変異を導入したもの、配列番号1の位置2678にAからTの変異を導入したもの、配列番号1の位置2826にAからGの変異を導入したベクターをそれぞれ細胞にトランスフェクションし、ベクター由来のmRNAを比較する。

その結果、配列番号1の位置2678にAからTの変異を導入したベクターのみで配列番号1の位置2636～2792が保持されたmRNAが増幅され、この変異がスプライス異常を引き起こすことが確認でき、これを検出することもできる。

たとえば、転写産物としてタンパク質を利用する場合、配列番号2のアミノ酸配列において位置159のアミノ酸残基がAspからGlyへ変異し

たタンパク質を検出する方法、上記のmRNAのスプライシング異常が原因で生じる配列番号5に示すタンパク質を検出する方法、配列番号5のアミノ酸配列において位置159のアミノ酸残基がAspからGlyへ変異したタンパク質を検出する方法などが挙げられ、好ましくは、配列番号2において位置159のアミノ酸残基がAspからGlyへ変異したタンパク質を検出する方法が挙げられる。この変異型タンパク質の検出は、通常のタンパク質のシーケンス方法に準ずればよいが、たとえば、変異型タンパク質のみを認識する抗体を作製し、ELISA法で検出する方法、タンパク質を単離し、直接または必要に応じ、酵素等で切断し、プロテインシーケンサーを利用して変異を検出する方法、アミノ酸の等電点の変異を検出する方法および質量分析により質量の差を検出する方法が挙げられ、好ましくは、変異型タンパク質のみを認識する抗体を作製し、ELISA法で検出する方法が挙げられる。

一方、RAの直接原因の一つに、アポトーシスの過剰の抑制があるが、アポトーシスは、たとえば、以下の順で引き起こされる。

デス因子（たとえば、Fasリガンド、TNF、Apo3L（DR3リガンド）およびTRAILなどが挙げられる）がデスレセプター（Fas、TNFレセプターおよびDR3などが挙げられる）に結合し、さらに、アダプタータンパク質（たとえば、FADDおよびTRADDなど）が結合し、さらにカスパーゼ分子群が関与し、最終的にアポトーシスを引き起こす。

たとえば、カスパーゼ8は、刺激により、デスレセプターにアダプタータンパク質を介して結合し、活性化カスパーゼ8となり、さらに下流のカスパーゼ3などを活性化させ、最終的にアポトーシスを引き起こす。

また、カスパーゼ 8 には、カスパーゼ 8/a およびカスパーゼ 8/b といったバリエーションが知られている。

本発明で検出されるゲノムから発現するタンパク質は、スプライシング異常により変異を有しており、この変異により、デスドメイン領域を欠損した DR 3 の変異型が発現する。DR 3 は、3 量体を形成しており、この 3 量体のデスドメイン領域にアダプタータンパク質が結合することが知られている。この変異型レセプターも同様に正常型レセプターと複合体を形成するが、この複合体には、アダプタータンパク質である TRADD が結合できず、結果としてカスパーゼ 8 が活性化されず、アポトーシスが誘導されない。

よって、本発明で検出される変異を有するゲノムから誘導される変異型 DR 3 は、機能的な働きはなく、ドミナントネガティブに作用すると考えられる。

これらは、たとえば、以下のような手順 (1) ~ (4) で確認することができる。

(1) 被験者からの細胞の取得

診断に使用する細胞は、常法により人体の全ての細胞より得ることが可能であるが、たとえば、末梢リンパ球、滑膜細胞、各臓器などから得ることができる。これらの得られた細胞は、適宜、培養し、増殖して利用することもできる。

使用する細胞は、好ましくは、末梢血単核球が挙げられる。

(2) 細胞の刺激

得られた細胞を試薬などで刺激する。刺激に利用する試薬は、通常の刺激に利用する試薬であれば特に限定されないが、たとえば、Fas リ

5 ガンド、TNF、DR3リガンドなどのデスレセプターのリガンド、抗 Fas 抗体、アクチノマイシンD、放射線、グルココルチコイド、ホルボール 1,2-ミリステート 13-アセテート (PMA)、フィトヘマグルチニン (PHA) などが挙げられ、これらを1種以上合わせて利用してもよい。また、好ましくは、DR3リガンド、PMA、PHAなどが挙げられ(ただし、PMA、PHAによる刺激はDR3を含めた様々なシグナル伝達系に関与する)、より好ましくは、DR3リガンドなどが挙げられる。

10 試薬を添加する時間は、特に限定されないが、例えば、1時間~72時間程度添加すればよく、好ましくは、12~48時間であればよい。

また、別途、刺激を与えない対照となる細胞を用意する。

(3) 刺激した細胞および対照の細胞は、たとえば、可溶化緩衝液等で溶解し、カスパーゼ8を検出する。

15 カスパーゼ8の検出は、通常行われるタンパク質の検出方法であれば、特に限定されないが、たとえば、ウエスタンブロッティングなどにより実施することができる。

ウエスタンブロッティングは、たとえば、SDS-ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動後、PVDF膜に転写し、カスパーゼ8に結合する標識された抗カスパーゼ8抗体で検出する方法が挙げられる。

20 (4) 結果

健常者においては、刺激した細胞でのカスパーゼ8の発現量は、刺激をしない細胞でのカスパーゼ8の発現量に対し、低下するのに対し、RA患者においては、低下しない。

以上より、RA患者においてDR3の異常によるアポトーシスの誘導

の阻害が示された。これは、R Aの発症要因であり、すなわち、ゲノムおよびその転写産物の変異がR Aの診断（発症または発症可能性の判定）に利用できることが裏付けられた。

また、上記の結果より、測定されたカスパーゼ8の濃度を刺激前後で比較し、その濃度が低下しない場合に被験者は、R A患者であるとの診断またはR Aの発症可能性が高いと判断することもできる。すなわち、ゲノムの転写産物が影響する他の変異を検出することでもR A患者であるとの診断またはR Aの発症可能性が高いと判断することができる。

（c）R Aの治療方法および治療薬剤としての正常型D R 3の利用

R Aの関節では、滑膜細胞が増殖の一因となって関節破壊が引き起こされる。したがって、滑膜細胞にアポトーシスを誘導することのできる抗 Fas 抗体は、R Aの治療薬として有効であると考えられる。実際、現在R Aの治療薬として抗 Fas 抗体の臨床試験が進められている。一方、D R 3ゲノムの変異に起因した上記の変異型D R 3は、細胞にアポトーシスを誘導することができないため、これがD R 3に変異を持つR A患者の病因であると考えられる。D R 3はFasと同様、デスレセプターファミリーに属し、細胞にアポトーシスを誘導することができる。したがって、D R 3に上記の変異を持つR A患者に正常型D R 3を補完すると、細胞にアポトーシスが誘導されると考えられ、抗 Fas 抗体と同様、R Aの治療法として有効であると考えられる。そこで、本発明は、以下のR Aの治療方法および治療薬剤を提供するものである。

・本発明に係るゲノムの転写産物である変異型D R 3を持つ慢性関節リウマチ患者に、その変異を持たない正常型D R 3または当該正常型D R 3をコードするDNA、あるいは、このD R 3のアゴニストとしての低

分子化合物を補完することを特徴とする慢性関節リウマチの治療方法。

・本発明に係るゲノムの転写産物である変異型DR3を持つ慢性関節リウマチ患者の治療に用いられる治療薬剤であって、その変異を持たない正常型DR3または当該正常型DR3をコードするDNA、あるいは、
5 このDR3のアゴニストとしての低分子化合物を主成分とする慢性関節リウマチの治療薬剤。

実際、後の実施例10にて詳述するとおり、正常型DR3の補完はRAの治療法として有用であることが実験により認められた。

正常型DR3の補完方法は特に限定されるものではなく、たとえば、
10 公知のタンパク質発現系や遺伝子導入方法などを用いることができ、具体的には、哺乳細胞にタンパク質を発現させる場合に用いる発現ベクターやウイルスベクターなどを用いた方法があげられる。また、DR3のアゴニストとして作用する低分子化合物を補完する場合、当該低分子化合物として具体的には、DR3リガンドとして公知である Apo3L (カレン
15 トバイオロジー (Curr. Biol.)、第8巻、第525～528頁、1998年) や、アゴニストとして作用する可能性のある抗DR3抗体などが挙げられる。抗DR3抗体として具体的には、イミューニティー (Immunity)
(第6巻、第79～88頁、1997年) に記載のポリクローナル抗体などが
挙げられ、これらは経口または静注などによって体内に投与する方法が
20 考えられる。なお、ここでいう低分子化合物とは、ペプチドなどのタンパク質を含めた化合物を示す。

また、上記正常型DR3または当該正常型DR3をコードするDNAと、上記DR3のアゴニストとしての低分子化合物は、治療薬剤として
択一的に使用されるだけでなく、組み合わせて使用することもできる。

従って、上記正常型DR3または当該正常型DR3をコードするDNAおよび、上記DR3のアゴニストとしての低分子化合物の少なくとも一方を用いた治療方法も有効である。

(d) 慢性関節リウマチの診断キット

- 5 本発明に係るRAの診断（発症または発症可能性の判定）キットは、上記のゲノムまたは転写産物の変異を検出できる試薬、たとえば、プライマー、プローブ、抗体などを含むものであれば特に限定されず、さらにその他の試薬を組み合わせることにより得ることができる。

10 たとえば、ゲノムを検出するキットとしては、上記の変異を1つ以上含むゲノム領域を増幅できるように設計されたプライマーを含み、さらに、上記の変異を1つ以上含むゲノム領域を検出できるように設計されたプローブ、制限酵素、マクサムギルバート法およびチェーンターミネーター法などの塩基配列決定法に利用される試薬など、変異を検出するために必要な試薬を1つ以上組み合わせたキットが挙げられる。また、
15 好ましくは、蛍光標識されたダイデオキシヌクレオチドを含むキットが挙げられる。

たとえば、タンパク質を検出するキットとしては、変異型タンパク質を認識する抗体を含むキットなどが挙げられる。

20 たとえば、mRNAを検出するキットとしては、変異を含む領域を増幅できるように設計されたプライマーを含み、さらに、変異を検出できるように設計されたプローブ、制限酵素、マクサムギルバート法およびチェーンターミネーター法などの塩基配列決定法に利用される試薬など、変異を検出するために必要な試薬を1つ以上、組み合わせたキットが挙げられる。また、好ましくは、蛍光標識されたダイデオキシヌクレオチ

ドを含むキットが挙げられる。

これらの診断（判定）キットを使用することにより、RAの診断（発症またはその発症可能性の判定）を高精度に行うことができる。

本発明の診断（判定）キットは、たとえば、プライマーを含むキットの場合、プライマーは、本発明の変異の1つ以上を検出できるものであれば、検出方法に応じて適宜選択することができるが、好ましくは、配列番号1の位置 2717～2736 のセンスプライマーと配列番号1の位置 3284～3306 のアンチセンスプライマーとのセットおよび配列番号1の位置 1051～1078 のセンスプライマーと配列番号1の位置 4058～4085 のアンチセンスプライマーとのセット、配列番号1の位置 21～38 のセンスプライマーと配列番号1の位置 1517～1535 のアンチセンスプライマーとのセット、さらに好ましくは、配列番号1の位置 1534～1556 のセンスプライマーと配列番号1の位置 3284～3306 のアンチセンスプライマーとのセット、配列番号1の位置 667～687 のセンスプライマーと配列番号1の位置 1517～1535 のアンチセンスプライマーとのセットが挙げられる。さらに、プライマー成分に加えて、本発明にかかる変異の存在の検出に応じた一乃至数個の試薬を組み合わせたものであってもよい。なお、かかる試薬は、採用される検出方法に応じて適宜選択採用されるが、例えば制限酵素 *ApaI*、*dATP*、*dUTP*、*dTTP*、*dGTP*、DNA合成酵素、RNA合成酵素等を挙げることができる。さらに、変異の検出の妨げとならない適当な緩衝液および洗浄液等が含まれていてもよい。

図面の簡単な説明

図 1 は、5 つの変異の位置を示した図である。

図 2 は、正常型および欠損型の対立遺伝子の電気泳動パターンを示した電気泳動写真である。

図 3 は、サザンブロッティングにより 5 つの変異によるスプライシング異常を検出した X 線フィルム写真である。

図 4 は、サザンブロッティングにより配列番号 1 の位置 2678 の変異が引き起こすスプライス異常を検出した X 線フィルム写真である。

図 5 は、抗 GFP 抗体で免疫沈降を行った後に、抗 Xpress 抗体でウェスタンブロットを行った結果の X 線フィルム写真である。

図 6 は、抗 His 抗体で免疫沈降を行った後に、抗 Flag 抗体でウェスタンブロットを行った結果の X 線フィルム写真である。

発明を実施するための最良の形態

つぎに、本発明を実施例および参考例により説明する。尚、実施例および参考例で使用される略号は、以下の意味を有する。

10xPfu 緩衝液：200mM トリス塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化カリウム、100mM 硫酸アンモニウム、20mM 硫酸マグネシウム、1% トライトン X-100、1mg/ml ウシ血清アルブミン

TAE 緩衝液：0.04M トリス酢酸、0.002M エチレンジアミン四酢酸

20 10xL 緩衝液：100mM トリス塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化マグネシウム、10mM ジチオスレイトール

10xH 緩衝液：500mM トリス塩酸 (pH7.5)、100mM 塩化マグネシウム、10mM ジチオスレイトール、1000mM 塩化ナトリウム

10xK 緩衝液：200mM トリス塩酸 (pH8.5)、100mM 塩化マグネシウム、

10mM ジチオスレイトール、1000mM 塩化カリウム

10xPCR II 緩衝液：500mM 塩化カリウム、100mM トリス塩酸 (pH8.3)

10xSSC：1.5M 塩化ナトリウム、0.15M クエン酸ナトリウム (pH7.0)

緩衝液A：100mM トリス塩酸 (pH9.5)、300mM 塩化ナトリウム

5 FCS：ウシ胎児血清

SDS：ドデシル硫酸ナトリウム

BSA：ウシ血清アルブミン

EDTA：エチレンジアミン四酢酸

IPTG：イソプロピルチオ- β -D-ガラクトシド

10 X-gal：5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド

PMA：ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート

PHA：フィトヘマグルチニン

可溶化緩衝液：50mM トリス塩酸 (pH7.5)、150mM 塩化ナトリウム、

15 1%NP40、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、プロテアーゼインヒビター
カクテル

2x サンプル緩衝液：50mM トリス塩酸 (pH6.8)、10%グリセロール、

2%SDS、2% β -メルカプトエタノール、0.1%プロモフェノールブルー

TBS 溶液：20mM トリス塩酸 (pH7.6)、137mM 塩化ナトリウム

20 Tween 20：ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート

TBS-T 溶液：20mM トリス塩酸 (pH7.6)、137mM 塩化ナトリウム、

0.05%Tween20

HRP：ホースラディッシュペルオキシダーゼ

洗浄緩衝液：50mM トリス塩酸 (pH7.5)、1M 塩化ナトリウム、0.1%

NP40、0.05%デオキシコール酸ナトリウム、プロテアーゼインヒビター
カクテル

また、M は mol/L を、mM は、mmol/L を；各溶液は特に記載がない限り、
水溶液を意味する。

5 実施例 1 DR3 ゲノムの変異した塩基配列の検出

(1) ゲノムDNAは、グアニジンチオシアネート法（日本輸血学会雑誌、第40巻、第2号、第413頁、1994年）により健常者およびRA患者の末梢血から調製した。すなわち、EDTA採血した末梢血10mlに細胞膜溶解液（I液：0.32Mショ糖、1%（v/v）トライトン（Triton）X-100、
10 5mM塩化マグネシウム、12mMトリス塩酸（pH7.6））20mlを加え、転倒混和後3000rpmで10分間遠心し、核を回収した。回収した核に核膜溶解液（II液：4Mグアニジンチオシアネート、12mMEDTA、375mM塩化ナトリウム、0.5%N-ドデカノイルサルコシン酸ナトリウム、0.1Mβ-メルカプトエタノール、12mMトリス塩酸（pH7.6））5mlを加え、
15 55℃で10分間保温し、エタノール沈殿によりゲノムDNAを調製した。

(2) 得られたゲノムDNA50ngに10xLA緩衝液（商品名：宝酒造社製）2.5μl、25mM塩化マグネシウム2.5μl、2.5mMデオキシヌクレオチド混合液4μl、20μMセンス、アンチセンスプライマーをそれぞれ0.25μl、DNAポリメラーゼ試薬（LA Taq DNA polymerase：宝酒造社製）1.25Uを加え、滅菌蒸留水により全量を25μlとし、PCR反応をおこなった。PCR反応は、熱変性98℃で20秒間、アニーリング・伸長反応68℃で5分間、35サイクルの条件で行った。得られたPCR産物は、市販のキット（QIAquick PCR Purification Kit：キアゲン社製）により精製した。センス、アンチセンスプライマーは、それぞれ配

20

列番号 1 の位置 1051~1078 および 4058~4085 の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを使用した。

(3) 精製した PCR 産物のシーケンス反応は、市販のキット (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit: パーキンエルマー社製) を用いてダイターミネーター法で実施した。

PCR 産物 50ng に混合試薬 (Terminator Ready Reaction Mix: パーキンエルマー社製) 4 μ l、プライマー 1.6pmol を加え、滅菌蒸留水で全量を 10 μ l にした。シーケンス反応は、96℃で 10 秒間、50℃で 5 秒間、60℃で 4 分間、25 サイクルでおこなった。反応液に 3M 酢酸ナトリウム (酢酸で pH5.2 に調整) 1 μ l および 95%エタノール 25 μ l を加え、氷冷下に 15 分間冷却した。反応液を 15000rpm で 20 分間遠心した後、沈殿を 70%エタノール 125 μ l で洗浄し、乾燥した。得られた沈殿をホルムアルデヒド/ブルーデキストラン (5:1) 溶液 3 μ l に溶解し、95℃で 2 分間加熱処理し、シーケンサー (ABI PRISM377 DNA Sequencer: パーキンエルマー社製) を用いて塩基配列を決定した。

プライマーには、配列番号 1 の位置 1535~1552 の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチド、および配列番号 1 の位置 2892~2912 の相補鎖に対応するオリゴヌクレオチドを使用した。

その結果、RA 患者の DR3 ゲノムには、配列番号 1 に示した健常者ゲノムにおける以下の (1) ~ (5) に示す塩基多型および塩基の欠損が見出された。

- (1) 位置 1755 の塩基のアデニン (A) からグアニン (G) への置換
- (2) 位置 2443~2456 の塩基の欠損
- (3) 位置 2531 の塩基のシトシン (C) からチミン (T) への置換

(4) 位置 2678 の塩基のアデニン (A) からチミン (T) への置換

(5) 位置 2826 の塩基のアデニン (A) からグアニン (G) への置換

実施例 2 配列番号 1 の位置 2443~2456 の塩基配列の欠損の検出

(1) ゲノム DNA 50ng に 10xLA 緩衝液 (商品名: 宝酒造社製) 2.5 μ l、
5 1、25mM 塩化マグネシウム 2.5 μ l、2.5mM デオキシヌクレオチド混合液
4 μ l、20 μ M センス、アンチセンスプライマーそれぞれ 0.25 μ l、DNA
A ポリメラーゼ試薬 (LA Taq DNA polymerase: 宝酒造社製) 1.25U を
加え、滅菌蒸留水により全量を 25 μ l とし、PCR 反応をおこなった。

PCR 反応は、熱変性 95°C で 1 分間、アニーリング 63°C で 1 分間、伸
10 長反応 72°C で 1 分間、35 サイクルの条件で行った。用いたセンス、ア
ンチセンスプライマーには、それぞれ配列番号 1 の位置 1534~1556 の
塩基配列に対応するオリゴヌクレオチド、配列番号 1 の位置 3284~
3306 の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを使用した。分子量マ

ーカー (100bp ladder: ニューイングランドバイオラボ (NEB) 社製)
15 と共にアガロースゲル (1% Agarose S: ニッポンジーン社製) にて
TAE 緩衝液中で電気泳動した。約 1.5kbp の PCR 産物をゲルから回収
し、市販キット (QIAquick Gel Extraction Kit: キアゲン社製) によ
り精製した。得られた PCR 産物 50ng、TA クローニングベクター
(pT7BlueT ベクター: ノバジェン (Novagen) 社製) 25ng、T4DNA リ
20 ガーゼ溶液 (DNA ligation kit Ver II の solution I: 宝酒造社製) 3
 μ l と混合し、16°C で 2 時間ライゲーションをおこなった。

(2) 得られたライゲーション液全量にコンピテント細胞 DH5 α を混合
し、氷冷下に 30 分間インキュベートした。次いで、42°C のウォーター
バスに 20 秒間浸けてヒートショックを加えた後、氷冷下に 2 分間冷却

した。これに SOC 培地 $900\mu\text{l}$ 加え、 37°C で 1 時間振とう培養した。この培養液を X-gal 0.1mM 、IPTG 0.1mM およびアンピシリン $50\mu\text{g/ml}$ を含む LB プレートに接種し、 37°C 、終夜培養してコロニーを形成させた。

(3) 形成したシングルコロニーをピックアップし、アンピシリン $50\mu\text{g/ml}$ を含む LB 培地 1.5ml に植え継ぎ、 37°C で終夜培養した。培養液を遠心し、上清を除去した菌体を溶液 1 (50mM グルコース、 10mM EDTA、 25mM トリス塩酸 ($\text{pH}8.0$)) $100\mu\text{l}$ に懸濁した。アルカリ溶液 (0.2M 水酸化ナトリウム、 1% SDS) $200\mu\text{l}$ を加え、穏やかに混和後、氷冷下に 5 分間インキュベートし、さらに 3M 酢酸カリウム溶液 (酢酸で $\text{pH}5.5$ に調整) $150\mu\text{l}$ を加え、氷冷下に 5 分間インキュベートした。得られた溶液を 12000rpm で 5 分間遠心した後、上清にフェノール/クロロホルム ($1:1$) 溶液 $400\mu\text{l}$ を加え、 12000rpm で 5 分間遠心した。水層にエタノール $800\mu\text{l}$ を加え、 12000rpm で 5 分間遠心した後、上清を除去した。沈殿を 70% エタノールで洗浄後、乾燥させ、滅菌蒸留水 $50\mu\text{l}$ に溶解させた。得られた溶液に 1mg/ml RNase A (Sigma 社製) $0.5\mu\text{l}$ を加え、 37°C で 1 時間インキュベートした後、 20% ポリエチレングリコール/ 2.5M 塩化ナトリウム溶液 $30\mu\text{l}$ を加え、氷冷下に 1 時間放置した。得られた溶液を 12000rpm で 10 分間遠心し、沈殿を 70% エタノールで洗浄し、乾燥させ、滅菌蒸留水 $30\mu\text{l}$ に溶解させた。

(4) プラスミド DNA のシーケンス反応は、市販キット (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit: パーキンエルマー社製) を用いたダイターミネーター法で実施した。

プラスミド DNA 300ng に混合試薬 (Terminator Ready Reaction Mix: パーキンエルマー社製) $4\mu\text{l}$ 、プライマー 1.6pmol を加え、滅菌

蒸留水で全量を $10\mu\text{l}$ にした。シーケンス反応は、 96°C で 10 秒間、 50°C で 5 秒間、 60°C で 4 分間、25 サイクルでおこなった。反応液に 3M 酢酸ナトリウム（酢酸で $\text{pH}5.2$ に調整） $1\mu\text{l}$ および 95%エタノール $25\mu\text{l}$ を加え、氷冷下に 15 分間冷却した。得られた溶液を 15000rpm で 20 分間遠心した後、沈殿を 70%エタノール $125\mu\text{l}$ で洗浄し、乾燥した。得られた沈殿をホルムアルデヒド/ブルーデキストラン (5:1) 溶液 $3\mu\text{l}$ に溶解し、 95°C で 2 分間加熱処理し、シーケンサー (ABI PRISM377 DNA Sequencer: パーキンエルマー社製) を用いて塩基配列を決定した。プライマーは、配列番号 1 の位置 2892~2912 の相補鎖の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを使用した。

その結果、変異を有するゲノムを増幅した PCR 産物をサブクローニングしたクローンは、配列番号 1 の位置 2443~2456 の塩基配列を欠損していた。

実施例 3 電気泳動による配列番号 1 の位置 2443~2456 の塩基配列の欠損の検出

ゲノム DNA 50ng に 10xPfu 緩衝液 (ストラタジーン (Stratagene) 社製) $2.5\mu\text{l}$ 、 2.5mM デオキシヌクレオチド混合物 $2\mu\text{l}$ 、 $20\mu\text{M}$ のセンス、アンチセンスプライマーをそれぞれ $0.25\mu\text{l}$ 、DNA ポリメラーゼ試薬 (Pfu DNA polymerase: ストラタジーン (Stratagene) 社製) 1.25U を加え、滅菌蒸留水により全量を $25\mu\text{l}$ とし、PCR 反応をおこなった。PCR 反応は、 95°C で 1 分間の後、熱変性 95°C で 1 分間、アニーリング 55°C で 1 分間、伸長反応 72°C で 1 分間、40 サイクルの条件で行った。プライマーは、センス、アンチセンスプライマーとして、それぞれ配列番号 1 の位置 2369~2389 の塩基配列に対応するオリゴヌク

レオチド、配列番号1の位置 2514~2535 の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを使用した。増幅したPCR産物は、分子量マーカー (100bp ladder: ニューイングランドバイオラボ (NEB) 社製) と共にアガロースゲル (3%GTG Agarose: 宝酒造社製) にてTAE緩衝液中で電気泳動し、エチジウムブロマイド溶液にて可視化した。結果を図2に示す。

正常型と欠損型の対立遺伝子を保有する検体では、分子量の異なる2つの増幅産物が検出されるが、正常型の対立遺伝子のみ保有する検体では分子量の大きい産物のみが検出された。

実施例4 配列番号1の5つの変異によるスプライシング異常の検出

(1) RAまたは健常者のゲノムDNA 50ng に 10xLA 緩衝液 (商品名: 宝酒造社製) 2.5 μ l、25mM 塩化マグネシウム 2.5 μ l、2.5mM デオキシヌクレオチド混合液 4 μ l、20 μ M センス、アンチセンスプライマーそれぞれ 0.25 μ l、DNAポリメラーゼ試薬 (LA Taq DNA polymerase: 宝酒造社製) 1.25Uを加え、滅菌蒸留水により全量を25 μ lとし、PCR反応をおこなった。PCR反応は、95℃で1分間の後、熱変性 95℃で1分間、アニーリング 63℃で1分間、伸長反応 72℃で2分間、35 サイクルの条件で行った。この反応に使用したプライマーを以下に示す。

センスプライマーA:

5'-GGGGTACCATCCGCTTCCTGCCCCAGCCAGGCTGGTTTGTGGAGTGC-3' (配列番号6)

アンチセンスプライマーA:

5'-CCGCTCGAGGGGCCACCTCCAGTGCCAGTGGCGGTATGTGTAGGTCAGG-3' (配列番号7)

号7)

増幅したPCR産物は、エタノール沈殿により精製した。得られたPCR産物に Kpn I (宝酒造社製) 10unit、10xL 緩衝液 (宝酒造社製) 3 μ l を加え、滅菌蒸留水で全量を 30 μ l にした。この反応液を 37°C で 4 時間保温後、Xho I (宝酒造社製) 10unit、10xH 緩衝液 (宝酒造社製) 4 μ l を加え、滅菌蒸留水で全量を 40 μ l にし、さらに 37°C で 4 時間保温した。この反応液を分子量マーカー (1kbp ladder: フェルメンタス社製) と共にアガロースゲル (1% Agarose S: ニッポンジーン社製) にて TAE 緩衝液中で電気泳動した。得られた約 1.8kbp のPCR産物をゲルから回収し、市販キット (QIAquick Gel Extraction Kit: キアゲン社製) により精製した。

(2) pcDNA3.1 ベクター (商品名: インビトロジェン社製) 3 μ g に Kpn I (宝酒造社製) 10unit、10xL 緩衝液 (宝酒造社製) 3 μ l を加え、滅菌蒸留水で全量を 30 μ l にした。この反応液を 37°C で 4 時間保温後、Xho I (宝酒造社製) 10unit、10xH 緩衝液 (宝酒造社製) 4 μ l を加え、滅菌蒸留水で全量を 40 μ l にし、さらに 37°C で 4 時間保温した。この反応液を分子量マーカー (1kbp ladder: フェルメンタス社製) と共にアガロースゲル (1% Agarose S: ニッポンジーン社製) にて TAE 緩衝液中で電気泳動した。5.6kbp のDNAバンドをゲルから回収し、市販キット (QIAquick Gel Extraction Kit: キアゲン社製) により精製した。

(3) 実施例4(1)で精製したPCR産物 50ng と実施例4(2)で精製した pcDNA3.1 ベクター35ng を T4DNA リガーゼ溶液 (DNA ligation kit Ver II の solution I: 宝酒造社製) 4 μ l と混合し、16°C で 4 時間

ライゲーションをおこなった。

(4) 実施例 2 (2) および (3) の方法と同様にしてトランスフォーメーションをおこない、プラスミド DNA を調製した。

(5) プラスミド DNA のシーケンス反応は、市販キット (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit: パーキンエルマー社製) を用い、ダイターミネーター法で実施した。

プラスミド DNA 300ng に混合試薬 (Terminator Ready Reaction Mix: パーキンエルマー社製) 4 μ l、プライマー 1.6pmol を加え、滅菌蒸留水で全量を 10 μ l にした。シーケンス反応は、96℃で 10 秒間、50℃で 5 秒間、60℃で 4 分間、25 サイクルで実施した。反応液に 3M 酢酸ナトリウム (酢酸で pH5.2 に調整) 1 μ l および 95%エタノール 25 μ l を加え、氷冷下に 15 分間冷却した。得られた溶液を 15000rpm で 20 分間遠心した後、沈殿を 70%エタノール 125 μ l により洗浄し、乾燥した。得られた沈殿をホルムアルデヒド/ブルーデキストラン (5:1) 3 μ l に溶解させ、95℃で 2 分間加熱処理した。ついで、シーケンサー (ABI PRISM377 DNA Sequencer: パーキンエルマー社製) を用いて塩基配列を決定し、配列番号 1 の位置 1755 の塩基の A から G への置換、配列番号 1 の位置 2443~2456 の塩基の欠損、配列番号 1 の位置 2531 の塩基の C から T への置換、配列番号 1 の位置 2678 の塩基の A から T への置換、配列番号 1 の位置 2826 の塩基の A から G への置換を有する変異型ベクターおよび変異を持たない正常型ベクターを構築した (図 1 参照)。

(6) 構築した正常型または変異型ベクター 10 μ g および RPMI1640/20%FCS 0.25ml に懸濁した 1×10^6 個のジャーカット (Jurkat) 細胞を

0.4mm ギャップのキュベット（ビーエム機器社製）にいれ、室温で 10 分間静置した。エレクトロポレーター（ジーンパルサーII：パイオラッド社製）を用い、200V、950 μ F の条件でトランスフェクションを実施した。電気ショック後、氷冷下に 10 分間静置し、RPMI1640/10%FCS
5 で全量を 4ml とし、6 ウェルプレートで 37℃、5%CO₂ で 24 時間培養した。この細胞に PMA（シグマ社製）20ng/ml および PHA（ディフコ社製）1 μ g/ml を加え、さらに 24 時間培養した。

得られた細胞を回収し、リン酸緩衝食塩水で洗浄後、Trizol 試薬（商品名：ギブコ社製）を用いた、チオシアン酸グアニジンフェノール
10 クロロホルム（AGPC）法により、total RNA を調製した。total RNA は、さらに DNase（ニッポンジーン社製）で処理した後、得られた total RNA 1 μ g を逆転写反应用キット（RNA PCRKit：パーキンエルマー社製）を用い、通常の逆転写反応により cDNA を調製した。

得られた cDNA 溶液 5 μ l に 10xPCR II 緩衝液（パーキンエルマー社製）2 μ l、25mM 塩化マグネシウム 1 μ l、20 μ M センス、アンチセンスプライマーをそれぞれ 0.25 μ l、DNA ポリメラーゼ試薬（Ampli
15 Taq Cold DNA polymerase：パーキンエルマー社製）1.25U を加え、滅菌蒸留水により全量を 25 μ l とし、PCR 反応をおこなった。PCR 反応は、95℃で 10 分間の後、熱変性 95℃で 1 分間、アニーリング 55℃で
20 1 分間、伸長反応 72℃で 1 分間を 40 サイクル、最後に 72℃で 5 分間の伸長反応の条件で行った。この反応に使用したセンス、アンチセンスプライマーは、以下のとおりである。

センスプライマー B：5'-ATCCGCTTCCTGCCCC-3'（配列番号 8）

アンチセンスプライマー B：5'-GGGGCCACCTCCAGTGCC-3'（配列番号 9）

なお各々の塩基配列は、センスプライマーA、アンチセンスプライマーAの一部の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドである。

(7) 得られたRT-PCR溶液を分子量マーカー (1 kbp ladder: フェルメンタス社製) と共にアガロースゲル (2% Agarose S: ニッポンジーン社製) にてTAE緩衝液中で電気泳動し、エチジウムブロマイド溶液にて可視化した。PCR産物をゲルから切り出し、市販キット (QIAquick Gel Extraction Kit: キアゲン社製) により精製した。得られたPCR産物 50ng、TA クローニングベクター (pT7BlueT ベクター: ノバジェン (Novagen) 社製) 25ng を T4DNA リガーゼ溶液 (DNA ligation kit Ver II の solution I: 宝酒造社製) 3 μ l と混合し、16°Cで2時間ライゲーションをおこなった。

(8) 実施例2に記載の方法と同様にしてプラスミドDNAを調製し、塩基配列を決定した。プライマーは、センスプライマーBおよびアンチセンスプライマーBで表わされるオリゴヌクレオチドを使用した。

その結果、配列番号1の位置 1755 の塩基配列がAからGへの変異、配列番号1の位置 2443~2456 の塩基配列の欠損、配列番号1の位置 2531 の塩基配列がCからTへの変異、配列番号1の位置 2678 の塩基配列がAからTへの変異、配列番号1の位置 2826 の塩基配列がAからGへの変異を有する変異型ベクターのmRNAに配列番号1の位置 2636~2792 が保持されたmRNAを検出した。

実施例5 サザンブロッティングによるスプライス異常の検出

(1) 実施例4(6)で得たRT-PCR溶液を分子量マーカー (1 kbp ladder: フェルメンタス社製) と共にアガロースゲル (2% Agarose S: ニッポンジーン社製) にてTAE緩衝液中で電気泳動を行った。ゲル

を変性溶液 (0.5M 水酸ナトリウム、1.5M 塩化ナトリウム) に 25 分間浸し、さらに中和溶液 (0.5M トリス塩酸 (pH7.5)、1.5M 塩化ナトリウム) に 30 分間浸した。キャピラリー法により、ゲル内の DNA をナイロンメンブレン (Hybond-N+ : アマシャムファルマシア社製) に一晚トランスファーし、UV クロスリンカー (日本ジェネティック社製) により DNA をメンブレンに固定した。キャピラリーの緩衝液は、10xSSC を用いた。ハイブリダイゼーションおよび DNA 断片の検出は、Gene Images 3' - オリゴラベリング・CDP-Star 検出システム (アマシャムファルマシア社製) を用いて以下のとおりに行った。DNA を固定したメンブレンをハイブリダイゼーション緩衝液 (5xSSC、0.1% (w/v) SDS、0.5% (w/v) デキストラン硫酸分子量 50 万 (シグマ社製)、キットに付属の 5% (v/v) ブロッキング試薬) に浸し、59℃で 30 分間振とうさせながらプレハイブリダイゼーションを行った。

(2) 市販キット (Gene Images 3' - オリゴラベリングキット : アマシャムファルマシア社製) により、配列番号 1 の位置 2715~2736 の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをフルオレセイン標識してプローブとして使用した。このプローブを 10ng/ml となるようにプレハイブリダイゼーション溶液に加え、さらに振とうさせながら 59℃で 2 時間ハイブリダイゼーションを行った。緩衝液 (5xSSC、0.1% (w/v) SDS) で 5 分間 2 回洗浄後、予め 50℃にした緩衝液 (1xSSC、0.1% (w/v) SDS) で 15 分間 2 回洗浄した。メンブレンを緩衝液 A で軽くリンスし、緩衝液 A で 10 倍希釈したキットに付属のブロッキング試薬を用いて室温 1 時間ブロッキングした。メンブレンを緩衝液 A で軽くリンスし、抗体希釈溶液 (キットに付属のアルカリフォスファターゼ標識抗フルオレセイ

ン抗体を 0.5% (w/v) BSA を含む緩衝液 A で 5000 倍希釈した溶液) に浸し、室温で 1 時間インキュベートした。0.3% (v/v) Tween20 含有緩衝液 A で 10 分間、3 回の洗浄を室温で振とうさせながら行った。メンブレンを緩衝液 A で軽くリンスし、キットに付属の検出試薬に浸した後、
5 X線フィルム (フジフィルム社製) に露光させた。結果を図 3 に示す。

変異型ベクターのみでプローブと結合する転写産物が検出され、5 つの変異によるスプライス異常が検出された。

実施例 6 配列番号 1 の位置 2678 の変異が引き起こすスプライス異常の検出

10 (1) 実施例 4 (5) で調製した正常型ベクターに配列番号 1 の位置 1755 の塩基配列に A から G への変異、配列番号 1 の位置 2531 の塩基配列に C から T への変異、配列番号 1 の位置 2678 の塩基配列に A から T への変異、配列番号 1 の位置 2826 の塩基配列に A から G への変異を市販キット (QuikChangeTMSite-Directed Mutagenesis kit: ストラタジーン (Stratagene) 社製) を用いて以下の方法で作製した。
15

(2) 正常型ベクター 50ng に、2.5mM デオキシヌクレオチド混合液 1 μ l、10xPfu 緩衝液 2.5 μ l、DNA ポリメラーゼ試薬 (Pfu Turbo DNA polymerase: ストラタジーン (Stratagene) 社製) 2.5U、センス、アンチセンスプライマーそれぞれ 62.5ng を加え、滅菌蒸留水で全量を 25 μ l にした。PCR 反応は、95℃で 30 秒間の後、熱変性 95℃で 30 秒間、
20 アニーリング 55℃で 1 分間、伸長反応 68℃で 15 分間を 12 サイクルの条件で行った。増幅した産物を Dpn I で消化し、この反応液 1 μ l とコンピテント細胞 XL-1 ブルーを混合し、氷冷下に 30 分間インキュベートした。ついで、42℃のウォーターバスに 30 秒間浸け、ヒートショック

を加えた後、氷冷下に2分間冷却した。これにNZY培地を加え、37℃で1時間振とう培養した。この培養液をアンピシリン 50 μ g/mlを含むLBプレートに接種し、37℃、終夜培養してコロニーを形成させた。実施例2(3)～(4)に記載の方法と同様にしてプラスミドDNAを調製し、塩基配列を決定し、それぞれの部位に変異を導入した変異型ベクターを作製した。この反応に用いたプライマーは、以下に示すとおりである。

・配列番号1の位置1755の塩基配列にAからGへの変異導入

センスプライマー：5'-GGTTCCTCCGAGAGGTACTGACTGTGGGA-3' (配列番号10) 10)

アンチセンスプライマー：5'-TCCCACAGTCAGTACCTCTGCGGGAACC-3' (配列番号11) 11)

・配列番号1の位置2531の塩基配列にCからTへの変異導入

センスプライマー：5'-CTTGGCTCACTATAACCTCTGCTGCCTGGG-3' (配列番号12) 12)

アンチセンスプライマー：5'-CCCAGGCAGCAGAGGTTATAGTGAGCCAAG-3' (配列番号13) 13)

・配列番号1の位置2678の塩基配列にAからTへの変異導入

センスプライマー：5'-GATGGTCTTGATCTCCTGACCTCGTGATCC-3' (配列番号14) 14)

アンチアンチセンスプライマー：

5'-GGATCACGAGGTCAGGAGATCAAGACCATC-3' (配列番号15) 15)

・配列番号1の位置2826の塩基配列にAからGへの変異導入

センスプライマー：5'-GCAACAGGGGACAGAATAGGCAAAATCCCTG-3' (配列

番号 16)

アンチセンスプライマー: 5'-CAGGGATTTTGCCTATTCTGTCCCCTGTTGC-3'

(配列番号 17)

5 (3) 実施例 4 (6) の方法と同様にして作製した変異型ベクターをジャーカット (Jurkat) 細胞にトランスフェクションし、実施例 4 (6) と同様の条件で RT-PCR をおこなった。さらに、実施例 5 に示す方法と同様にしてサザンブロッティングをおこなった。結果を図 4 に示す。

10 配列番号 1 の位置 2678 に A から T の変異を導入したベクターのみに
おいて、プローブと結合するバンドが検出され、この変異がスプライス
異常を引き起こすことが明らかとなった。

実施例 7 RA 患者に対して変異の検出

実施例 1 (1) ~ (3) の方法と同様にして RA 患者に対し、ゲノム
の変異を検討した。

15 その結果、患者本人以外の親族に RA 発症者がいる患者群 (以下、RA
家系と称する) の RA 患者で 60 例中 6 例、RA 家系の健常者で 31 例
中 4 例、患者本人以外の親族に RA 発症者がいない患者群の RA 患者で
494 例中 11 例、一般健常者で 481 例中 3 例において変異が観察され、
RA 家系において著しく高頻度に変異が見出された。なお、観察された
変異の多くはヘテロ接合体であった。

20 実施例 8 DR3 ゲノムの変異した塩基配列の検出

(1) ゲノム DNA は、グアニジンチオシアネート法 (日本輸血学会雑誌、第 40 巻、第 2 号、第 413 頁、1994 年) により末梢血から調製した。
すなわち、EDTA 採血した末梢血 10ml に細胞膜溶解液 (I 液: 0.32M シ
ョ糖、1% (v/v) トライトン (Triton) X-100、5mM 塩化マグネシウム、

12mM トリス塩酸 (pH7.6)) 20ml を加え、転倒混和後 3000rpm で 10 分間遠心し、核を回収した。回収した核に核膜溶解液 (II 液: 4M グアニジンチオシアネート、12mM EDTA、375mM 塩化ナトリウム、0.5% N-ドデカノイルサルコシン酸ナトリウム、0.1M β -メルカプトエタノール、12mM トリス塩酸 (pH7.6)) 5ml を加え、55℃で 10 分間保温し、エタノール沈殿によりゲノムDNAを調製した。

(2) 得られたゲノムDNA 50ng に 10xPCR II 緩衝液 (商品名: パーキンエルマー社製) 2.5 μ l、25mM 塩化マグネシウム 2.5 μ l、2mM デオキシヌクレオチド混合液 5 μ l、20 μ M センス、アンチセンスプライマーをそれぞれ 0.25 μ l、DNA ポリメラーゼ試薬 (AmpliTaq GOLD: パーキンエルマー社製) 1.25U を加え、滅菌蒸留水により全量を 25 μ l とし、PCR 反応を行った。PCR 反応は、95℃で 10 分間の酵素活性化反応後、熱変性反応 95℃1 分間、アニーリング反応 60℃1 分間、伸長反応 72℃2 分間を 40 サイクル、最後に伸長反応を 72℃で 5 分間行った。得られた PCR 産物は、自動分注ロボット (バイオメック 2000: ベックマンコールター社製) によりマルチスクリーン PCR (商品名: ミリポア社製) を用いて精製した。センス、アンチセンスプライマーは、それぞれ配列番号 1 の位置 21~38 および 1517~1535 の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを使用した。

(3) 精製した PCR 産物のシーケンス反応は、市販のキット (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit: パーキンエルマー社製) を用いてダイターミネーター法で実施した。

PCR 産物 50ng に混合試薬 (Terminator Ready Reaction Mix: パーキンエルマー社製) 4 μ l、プライマー 1.6pmol を加え、滅菌蒸留水で全

量を $10\mu\text{l}$ にした。シーケンス反応は、 96°C で 10 秒間、 50°C で 5 秒間、 60°C で 4 分間、25 サイクルでおこなった。シーケンス反応後のサンプルからの未反応デオキシヌクレオチドの除去は、セファデックス G-50 (アマシャムファルマシア社製) およびマルチスクリーン-HV (商品名: ミリポア社製) を用いたゲル濾過法により行った。精製したシー

5 シーケンス産物に滅菌蒸留水を $10\mu\text{l}$ 添加し、 96°C で 2 分間加熱処理し、シーケンサー (ABI PRISM3700 DNA Analyzer: パーキンエルマー社製) を用いて塩基配列を決定した。

シーケンスプライマーは、配列番号 1 の位置 1073-1102 の相補鎖の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを使用した。

10

その結果、RA 患者の DR3 ゲノムに、配列番号 1 の位置 921 の塩基 C から T への一塩基多型が見出された。

位置 921 の塩基は、cDNA としてジーンバンクに登録されている配列 (アクセッション番号 NM-003790) のエクソン 3 の 5' 末端の塩基を

15 基準とし、一塩基前のイントロンの塩基番号を -1 番目とすると、-53 番目に相当する。

実施例 9 RA 患者に対しての変異の検出

実施例 8 (1) から (3) の方法と同様にして RA 患者に対して、ゲノムの変異を検討した。

20 その結果、RA 家系の RA 患者で 43 例中 6 例、RA 家系の健常者で 25 例中 4 例において変異が見出された。これら変異が見出された 10 人では配列番号 1 の位置 1755、2531、2678、2826 の各一塩基変異および位置 2443~2456 の塩基欠損が同時に検出された。言い換えれば、上記した 6 つの塩基の変異または欠損が同時に生じている。なお、観察され

た変異はいずれもヘテロ接合体であった。

参考例 1 正常型および変異型 DR 3 タンパクの結合実験

(1) DR 3 cDNA の調製

ヘパリン採血した RA 患者の末梢血 10ml を等量のリン酸緩衝液 (PBS) と混和し、これを Lymphoprep (第一化学薬品社) 20ml に重層した。1500rpm で 30 分間遠心後、末梢血単核球の層を採取し、PBS で洗浄した。細胞を培地 (RPM11640/10%FCS) に 5×10^5 cells/ml となるよう懸濁し、この細胞懸濁液 10ml を 10cm dish に播き、PMA (シグマ社) 20ng/ml および PHA (ディフコ社) $1 \mu\text{g/ml}$ の刺激下、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件で 48 時間培養した。得られた細胞に Trizol 試薬 (商品名: ギブコ社製) を 1ml 加え、チオシアン酸グアニジンフェノールクロロホルム (AGPC) 法により total RNA を調製した。total RNA は逆転写反应用キット (RNA PCR Kit: パーキンエルマー社製) を用い、通常の逆転写反応により cDNA を調製した。

(2) 得られた cDNA 溶液 $5 \mu\text{l}$ に $10 \times \text{PCR II}$ 緩衝液 (パーキンエルマー社製) $2 \mu\text{l}$ 、 25mM 塩化マグネシウム $1 \mu\text{l}$ 、 $20 \mu\text{M}$ センス、アンチセンスプライマーをそれぞれ $0.25 \mu\text{l}$ 、DNA ポリメラーゼ試薬 (Ampli Taq Cold DNA polymerase: パーキンエルマー社製) 1.25U を加え、滅菌蒸留水により全量を $25 \mu\text{l}$ とし、PCR 反応を行った。PCR 反応は、 95°C で 10 分間の後、熱変性 95°C で 1 分間、アニーリング 55°C で 1 分間、伸長反応 72°C で 2 分間を 40 サイクル、最後に 72°C で 5 分間の伸長反応の条件で行った。この反応に使用したセンス、アンチセンスプライマーは、以下のとおりである。

配列番号 2 の位置 21~38 のセンスプライマーと、配列番号 2 の位置

1323～1342 のアンチセンスプライマー

配列番号 4 の位置 21～38 のセンスプライマーと、配列番号 4 の位置
712～731 のアンチセンスプライマー

(3) 得られた R T - P C R 溶液を分子量マーカー (100 bp ladder :
5 フェルメンタス社製) と共にアガロースゲル (1% Agarose S : ニッポ
ンジーン社製) にて TAE 緩衝液中で電気泳動し、エチジウムブロマイド
溶液にて可視化した。P C R 産物をゲルから切り出し、市販キット
(QIAquick Gel Extraction Kit : キアゲン社製) により精製した。得
られた P C R 産物 50ng、TA クローニングベクター (pT7BlueT ベクタ
10 ー : ノバジェン (Novagen) 社製) 25ng を T4DNA リガーゼ溶液 (DNA
ligation kit Ver II の solution I : 宝酒造社製) 3 μ l と混合し、
16℃で 2 時間ライゲーションを行った。

(4) 実施例 2 に記載の方法と同様にしてプラスミド DNA を調製し、
塩基配列を決定し、配列番号 2 の位置 21～1342 の c D N A または配列
15 番号 4 の位置 21～731 の c D N A をクローン化したプラスミドを得た。

(5) タグ付 D R 3 発現ベクターの構築

得られた配列番号 2 の位置 21～1342 がクローン化されたプラスミド
2 μ g に BamH I (宝酒造社製) 5unit、Xba. I (宝酒造社製) 5unit、10xK
緩衝液 (宝酒造社製) 1.25 μ l を加え、滅菌蒸留水で全量を 25 μ l にし
20 た。この反応液を 37℃で 4 時間保温後、分子量マーカー (1kbp
ladder : フェルメンタス社製) と共にアガロースゲル (1% Agarose
S : ニッポンジーン社製) にて TAE 緩衝液中で電気泳動した。約 1.3kbp
の D N A バンドをゲルから回収し、市販キット (QIAquick Gel
Extraction Kit : キアゲン社製) により精製した。

(6) pcDNA3.1/His ベクター (商品名: インビトロジェン社製) 2 μ g に BamH I (宝酒造社製) 5unit、Xba I (宝酒造社製) 5unit、10xK 緩衝液 (宝酒造社製) 1.25 μ l を加え、滅菌蒸留水で全量を 25 μ l にした。

この反応液を 37℃ で 4 時間保温後、分子量マーカー (1kbp ladder: フェルメンタス社製) と共にアガロースゲル (1% Agarose S: ニッポンジーン社製) にて TAE 緩衝液中で電気泳動した。5.5kbp の DNA バンドをゲルから回収し、市販キット (QIAquick Gel Extraction Kit: キアゲン社製) により精製した。

(7) 参考例 1 (5) で精製した DNA 断片 30ng と参考例 1 (6) で精製した pcDNA3.1/His ベクター 30ng を T4DNA リガーゼ溶液 (DNA ligation kit Ver II の solution I: 宝酒造社製) 4 μ l と混合し、16℃ で 2 時間ライゲーションを行った。

(8) 実施例 2 に記載の方法と同様にしてプラスミド DNA を調製し、配列番号 2 の位置 21~1342 が組み換えられたエクスプレス (Xpress) タグの付いた発現ベクターを構築した。

(9) 参考例 1 (4) で得た配列番号 2 の位置 21~1342 がクローン化されたプラスミド 2 μ g に Sal I (宝酒造社製) 5unit、EcoR I (宝酒造社製) 5unit、10xH 緩衝液 (宝酒造社製) 2.5 μ l を加え、滅菌蒸留水で全量を 25 μ l にした。この反応液を 37℃ で 4 時間保温後、分子量マーカー (1kbp ladder: フェルメンタス社製) と共にアガロースゲル (1% Agarose S: ニッポンジーン社製) にて TAE 緩衝液中で電気泳動した。約 1.3kbp の DNA バンドをゲルから回収し、市販キット (QIAquick Gel Extraction Kit: キアゲン社製) により精製した。

(10) pEGEP-C2 ベクター (商品名: クローンテック社製) 2 μ g を参

考例 1 (9) と同様にして Sal I および EcoR I で消化し、4.7kbp の DNA バンドをゲルから回収し、市販キット (QIAquick Gel Extraction Kit: キアゲン社製) により精製した。

(11) 参考例 1 (9) で精製した DNA 断片 30ng および参考例 1 (10) で精製した pEGEP-C2 ベクター 30ng を T4DNA リガーゼ溶液 (DNA ligation kit Ver II の solution I: 宝酒造社製) 4 μ l と混合し、16℃で 2 時間ライゲーションを行った。

(12) 実施例 2 に記載の方法と同様にしてプラスミド DNA を調製し、配列番号 2 の位置 21~1342 が組み換えられた EGFP (Enhanced green fluorescent protein) タグの付いた発現ベクターを構築した。

(13) 参考例 1 (4) で得た配列番号 3 の位置 21~731 がクローン化されたプラスミド 2 μ g に Sal I (宝酒造社製) 5unit、10xH 緩衝液 (宝酒造社製) 4 μ l を加え、滅菌蒸留水で全量を 40 μ l にした。この反応液を 37℃で 4 時間保温後、フェノール/クロロホルム (1:1) 溶液で除タンパクし、エタノール沈殿によりプラスミドを回収した。得られたプラスミドに BamH I (宝酒造社製) 5unit、10xK 緩衝液 (宝酒造社製) 4 μ l を加え、滅菌蒸留水で全量を 40 μ l にした。この反応液を 37℃で 4 時間保温後、分子量マーカー (100 bp ladder: ニューイングランドバイオラボ (NEB) 社製) と共にアガロースゲル (1% Agarose S: ニッポンジーン社製) にて TAE 緩衝液中で電気泳動した。約 0.8kbp の DNA バンドをゲルから回収し、市販キット (QIAquick Gel Extraction Kit: キアゲン社製) により精製した。

(14) pEGEP-C1 ベクター (商品名: クローンテック社製) 2 μ g を参考例 1 (13) と同様にして Sal I および BamH I により消化し、

4.7kbp の DNA バンドをゲルから回収し、市販キット (QIAquick Gel Extraction Kit: キアゲン社製) により精製した。

(15) 参考例 1 (13) で精製した DNA 断片 30ng と参考例 1 (14) で精製した pEGEP-C1 ベクター 30ng を T4DNA リガーゼ溶液 (DNA ligation kit Ver II の solution I: 宝酒造社製) 4 μ l と混合し、16℃で 2 時間ライゲーションを行った。

(16) 実施例 2 に記載の方法と同様にしてプラスミド DNA を調製し、配列番号 4 の位置 21~731 が組み換えられた EGFP タグの付いた発現ベクターを構築した。

10 (17) 実施例 6 (1) および (2) の方法と同様にして、参考例 1 (4) で得た配列番号 2 の位置 21~1342 の cDNA または配列番号 4 の位置 21~731 の cDNA をクローン化したプラスミドに変異導入をおこなった。変異を導入した塩はいずれも配列番号 4 または 2 の 564 番目の塩基 (配列番号 1 の位置 1755 に相当する) であり、この塩基を A から G に置換した。この変異導入によりいずれのタンパクも 159 番目の Asp が Gly に置換される。なお、このときに使用したプライマーセットは以下のとおりである。

センスプライマー: 5'-TGTTCCCGCAGAGGTACTGACTGTGGGA-3' (配列番号 18)

20 アンチセンスプライマー: 5'-TCCCACAGTCAGTACCTCTGCGGGAACA-3' (配列番号 19)

(18) 得られたプラスミドを用い、参考例 1 (9) ~ (12) と同様にして配列番号 2 の位置 564 に A から G の変異を有する 21~1342 が組み換えられた EGFP タグの付いた発現ベクターを構築した。また参考例

1 (13) ~ (16) と同様にして、配列番号 4 の位置 564 に A から G の変異を有する 21~731 が組み換えられた EGFP タグの付いた発現ベクターを構築した。

以降、これらタグを付けた発現ベクターを以下のように呼ぶ。

- 5 配列番号 2 の位置 21~1342 が組み換えられたエクスプレス (Xpress) タグの付いた発現ベクター：ベクター A

配列番号 2 の位置 21~1342 が組み換えられた EGFP タグの付いた発現ベクター：ベクター B

- 10 配列番号 2 の位置 564 に A から G の変異を有する 21~1342 が組み換えられた EGFP

タグの付いた発現ベクター：ベクター C

配列番号 4 の位置 21~731 が組み換えられた EGFP タグの付いた発現ベクター：ベクター D

- 15 配列番号 4 の位置 564 に A から G の変異を有する 21~731 が組み換えられた EGFP タグの付いた発現ベクター：ベクター E

- (19) トランスフェクションを行う前日に、DMEM/10%FCS に懸濁した 293T 細胞を 2×10^5 ずつ 6 穴プレートに播いておく。トランスフェクションは、ギブコ社のリポフェクトアミンプラス試薬を用いたリポフェクション法により行った。ベクター A $0.5 \mu\text{g}$ とベクター B、C、D、E をそれぞれ $0.5 \mu\text{g}$ 混合し、これにリポフェクション試薬（プラス試薬：ギブコ社製）を $6 \mu\text{l}$ 加え、DMEM で全量を $100 \mu\text{l}$ とし室温で 15 分間放置した。この溶液にリポフェクトアミン試薬（商品名：ギブコ社製） $4 \mu\text{l}$ および DMEM $96 \mu\text{l}$ を加え、さらに 15 分間室温で放置後、DMEM を $800 \mu\text{l}$ 添加し、全量を 1ml にした。細胞を播いたプレートから上清を
- 20

除き、この溶液を全量加え、37℃、5%CO₂の条件で3時間培養した。上清を除きDMEM/10%FCSを3ml加え、さらに48時間培養後、細胞を回収した。得られた細胞はPBSで洗浄後、可溶化緩衝液250μlに懸濁し、超音波により破碎した。この細胞破碎液を15000rpm、10分間遠心し、この上清を細胞可溶化液として実験に供した。

(20) 得られた細胞可溶化液200μlに可溶化緩衝液を300μl加え、さらにプロテインA-アガロース溶液(ロシュ社製)25μlを加え、4℃で4時間転倒攪拌した。12000rpm20秒間遠心し、採取した上清に抗GFP抗体(サンタクルーズ社製)を1μg加え、4℃で2時間転倒攪拌した。この溶液にプロテインA-アガロース溶液(ロシュ社製)を25μl加え、4℃で一晩転倒攪拌した。12000rpm20秒間遠心し、上清を除去後、洗浄のため沈殿を可溶化緩衝液500μlに懸濁して4℃で20分転倒攪拌した。この洗浄操作を計3回行った後、2xサンプル緩衝液30μlに懸濁し、95℃、5分間加熱し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)のサンプルとした。

(21) 得られたサンプル20μlをプロテインマーカー(プレステインマーカー、ブロード:アプロサイエンス社製)とともに7.5%SDS-PAGEゲルにて、常法のSDS-PAGEを行った。泳動後、セミドライ式プロッティング装置によりタンパク質をPVDF膜(ミリポア社製)に転写した。転写用緩衝液には、100mM トリス、192mM グリシン、10%メタノールを用いた。

(22) タンパク質を転写したPVDF膜を5%脱脂粉乳含有TBS溶液に浸し、室温1時間振とうした。次いでTBS溶液に抗エクスプレス抗体(インビトロジェン社製)を1000分の1(溶媒に対する容量比)加えた溶

液に浸し、室温で一晩反応させた。PVDF膜を0.05%Tween-20を含むTBS溶液で10分間3回洗浄後、0.1%Tween-20を含むTBS溶液にHRP標識抗マウスIgG抗体（アマシャムファルマシア社製）を1000分の1（溶媒に対する容量比）加えた溶液に浸し、室温で2時間反応させた。

5 0.1%Tween-20を含むTBS溶液で10分間3回洗浄後、検出試薬（ECLシステム：アマシャムファルマシア社製）に浸し、X線フィルムに露光させた。

結果を図5に示す。ベクターB、C、D、Eから発現されるタンパク質はいずれもベクターAから発現されるタンパク質と結合することが明らかとなった。すなわち、正常型のDR3タンパクが正常型のタンパクとコンプレックスを形成することはもとより、ベクターC、D、Eから発現される変異型のタンパクともコンプレックスを形成することが明らかとなった。

参考例2 正常型DR3とTRADDとの結合に対する変異型DR3の効果

15 (1) TRADD cDNAの調製

cDNA溶液（ヒト精巣 Marathon-Ready cDNA：商品名、クロンテック社製） $0.5\mu\text{l}$ に10xLA緩衝液（商品名：宝酒造社製） $2.5\mu\text{l}$ 、25mM塩化マグネシウム $2.5\mu\text{l}$ 、2.5mMデオキシヌクレオチド混合液 $4\mu\text{l}$ 、20 μM センス、アンチセンスプライマーをそれぞれ $0.25\mu\text{l}$ 、DNAポリメラーゼ試薬（LA Taq DNA polymerase：宝酒造社製）1.25Uを加え、滅菌蒸留水により全量を $25\mu\text{l}$ とし、PCR反応を行った。PCR反応は、95℃で1分間の後、熱変性95℃で1分間、アニーリング62℃で1分間、伸長反応72℃で1分間を35サイクル、最後に72℃で5分間の伸長反応の条件で行った。この反応に使用したセンス、アンチセンスプラ

イマーは、以下のとおりである。

センスプライマー：5' -CGAGGCGGCCAGGAGGTG-3' (配列番号 20)

アンチセンスプライマー：5' -GGTTCAGCAATAGCCGCAGA-3' (配列番号 21)

5 (2) 得られた溶液を分子量マーカー (100 bp ladder：フェルメンタス社製) と共にアガロースゲル (1% Agarose S：ニッポンジーン社製) にて TAE 緩衝液中で電気泳動し、エチジウムブロマイド溶液にて可視化した。PCR 産物をゲルから切り出し、市販キット (QIAquick Gel Extraction Kit：キアゲン社製) により精製した。得られた PCR 産物
10 25ng、TA クローニングベクター (pT7BlueT ベクター：ノバジェン (Novagen) 社製) 25ng を T4DNA リガーゼ溶液 (DNA ligation kit Ver. II の solution I：宝酒造社製) 2.5 μ l と混合し、16℃で1時間ライゲーションを行った。

(3) 実施例 2 に記載の方法と同様にしてプラスミド DNA を調製し、
15 塩基配列を決定し、TRADD cDNA をクローン化したプラスミドを得た。

(4) タグ付 TRADD 発現ベクターの構築

参考例 2 (3) で得た TRADD cDNA がクローン化されたプラスミド 2 μ g に EcoR I (宝酒造社製) 5unit、Sal I (宝酒造社製) 5unit、10xH 緩衝液 (宝酒造社製) 3 μ l を加え、滅菌蒸留水で全量を 30 μ l にした。
20 この反応液を 37℃で 4 時間保温後、分子量マーカー (1kbp ladder：フェルメンタス社製) と共にアガロースゲル (1% Agarose S：ニッポンジーン社製) にて TAE 緩衝液中で電気泳動した。約 1kbp の DNA バンドをゲルから回収し、市販キット (QIAquick Gel Extraction Kit：キアゲン社製) により精製した。

(5) pCMV-Tag2 ベクター (商品名: ストラタジーン社製) $1\mu\text{g}$ に EcoR I (宝酒造社製) 5unit、Sal I (宝酒造社製) 5unit、10xH 緩衝液 (宝酒造社製) $3\mu\text{l}$ を加え、滅菌蒸留水で全量を $30\mu\text{l}$ にした。この反応液を 37°C で 4 時間保温後、分子量マーカー (1kbp ladder: フェルメンタス社製) と共にアガロースゲル (1% Agarose S: ニッポンジー

5 メンタス社製) にて TAE 緩衝液中で電気泳動した。4.3kbp の DNA バンドをゲルから回収し、市販キット (QIAquick Gel Extraction Kit: キアゲン社製) により精製した。

(6) 参考例 2 (4) で精製した DNA 断片 30ng と参考例 2 (5) で精製した pCMV-Tag2 ベクター 30ng を T4DNA リガーゼ溶液 (DNA ligation kit Ver II の solution I: 宝酒造社製) $2.5\mu\text{l}$ と混合し、 16°C で 2 時間ライゲーションを行った。

10

(7) 実施例 2 に記載の方法と同様にしてプラスミド DNA を調製し、フラッグ (Flag) タグの付いた TRADD 発現ベクターを構築した。以降、このベクターをベクター F と記載する。

15

(8) トランスフェクションを行う前日に、DMEM/10%FCS に懸濁した 293T 細胞を 2×10^5 ずつ 6 穴プレートに播いておく。トランスフェクションは、ギブコ社のリポフェクトアミンプラス試薬を用いたリポフェクション法により行った。ベクターの組合せは以下のようにした。

- 20
1. pcDNA3.1/His C (商品名: インビトロジェン社製) $0.2\mu\text{g}$ 、ベクター F $0.1\mu\text{g}$
 2. ベクター A $0.2\mu\text{g}$ 、ベクター F $0.1\mu\text{g}$
 3. ベクター A $0.2\mu\text{g}$ 、ベクター E $0.1\mu\text{g}$ 、ベクター F $0.1\mu\text{g}$
 4. ベクター A $0.2\mu\text{g}$ 、ベクター E $0.2\mu\text{g}$ 、ベクター F $0.1\mu\text{g}$

ベクターAおよびEは参考例1に示すものであり、ベクターAにはエク
スプレス (Xpress) タグに加え His タグが付加されている。なお、ベク
ターの全量は pcDNA3.1 (商品名: インビトロジェン社製) により $1\mu\text{g}$
とした。上記 1-4 にリポフェクション試薬 (プラス試薬: ギブコ社製)
5 を $6\mu\text{l}$ 加え、DMEM で全量を $100\mu\text{l}$ とし室温で 15 分間放置した。この
溶液にリポフェクトアミン試薬 (ギブコ社製) $4\mu\text{l}$ および DMEM $96\mu\text{l}$
を加え、さらに 15 分間室温で放置後、DMEM を $800\mu\text{l}$ 添加し、全量を
1ml にした。細胞を播いたプレートから上清を除き、この溶液を全量加
え、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件で 3 時間培養した。上清を除き DMEM/10%FCS を
10 3ml 加え、さらに 24 時間培養後、細胞を回収した。得られた細胞は PBS
で洗浄後、可溶化緩衝液 $250\mu\text{l}$ に懸濁し、超音波により破碎した。こ
の細胞破碎液を 15000rpm 、10 分間遠心し、上清を細胞可溶化液として
実験に供した。

(9) 細胞可溶化液 $100\mu\text{g}$ に可溶化緩衝液を加え全量を $500\mu\text{l}$ とし、
15 さらにプロテインA-アガロース溶液 (ロシュ社製) $25\mu\text{l}$ を加え、
 4°C で 4 時間転倒攪拌した。 12000rpm 20 秒間遠心し、採取した上清に
抗 HisG 抗体 (商品名: インビトロジェン社製) を $1\mu\text{g}$ 加え、 4°C で 2
時間転倒攪拌した。この溶液にプロテインA-アガロース溶液を $25\mu\text{l}$
加え、 4°C で一晩転倒攪拌した。 12000rpm 20 秒間遠心し、上清を除去後、
20 洗浄のため沈殿を可溶化緩衝液 $500\mu\text{l}$ に懸濁して 4°C で 20 分転倒攪拌
した。この操作を 2 回行った後、洗浄緩衝液 $500\mu\text{l}$ にてさらに同様の
洗浄を 2 回行い、最後にもう一度可溶化緩衝液 $500\mu\text{l}$ にて洗浄をおこ
なった。沈殿を 2x サンプル緩衝液 $30\mu\text{l}$ に懸濁し、 95°C 、5 分間加熱
し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) のサンプルとした。

(10) 得られたサンプル 20 μ l をプロテインマーカー（プレステイン
ドマーカー、ブロード：アプロサイエンス社製）とともに 9 % SDS-
PAGE ゲルにて、常法の SDS-PAGE を行った。泳動後、セミドライ式ブ
ロッキング装置によりタンパク質を PVDF 膜に転写した。転写用緩衝液
5 には、100mM トリス、192mM グリシン、10%メタノールを用いた。

(11) タンパク質を転写した PVDF 膜を 5%脱脂粉乳含有 TBS 溶液に浸
し、室温 1 時間振とうした。次いで TBS 溶液に抗 Flag 抗体（シグマ社
製）を 1000 分の 1（溶媒に対する容量比）加えた溶液に浸し、室温で
30 分反応させた。PVDF 膜を TBS 溶液で 1-2 分間 3 回洗浄後、TBS 溶液
10 に HRP 標識抗マウス IgG 抗体（アマシャムファルマシア社製）を 1000
分の 1（溶媒に対する容量比）加えた溶液に浸し、室温で 30 分反応さ
せた。TBS 溶液で 15 分間 3 回洗浄後、検出試薬（ECL システム：アマ
シャムファルマシア社製）に浸し、X 線フィルムに露光させた。

結果を図 6 に示す。正常型 DR3 と変異型 DR3 を同時に発現させると、
15 変異型 DR3 の量依存的に正常型 DR3 に結合した TRADD の量が減少した
（レーン 3、4）。すなわち、変異型 DR3 は正常型 DR3 と TRADD との結
合を阻害した。

参考例 3 末梢血単核球におけるカスパーゼ 8 の発現

(1) ヘパリン採血した RA 患者 5 例および健常人 4 例の末梢血 10ml
20 を等量の PBS と混和し、これを Lymphoprep（第一化学薬品社）20ml に
重層した。1500rpm で 30 分間遠心後、末梢血単核球の層を採取し、PBS
で洗浄した。細胞を培地（RPM11640/10%FCS）に 5×10^5 cells/ml となる
よう懸濁し、この細胞懸濁液 10ml を 10cm のシャーレに播き、PMA（シ
グマ社）20ng/ml および PHA（ディフコ社）1 μ g/ml の刺激下または非

刺激下、37℃、5%CO₂で48時間培養した。細胞を回収し、PBSで洗浄後、細胞を可溶化緩衝液150μlに懸濁し、氷冷下に30分間インキュベートした。この溶液を、15000rpm、10分間遠心し、上清を分取し、細胞溶解液とした。

5 (2) 得られた細胞溶解液10μgをプロテインマーカー（プレステインマーカー、ブロード：アプロサイエンス社製）とともに7.5%SDS-PAGEゲルにて、常法のSDS-PAGEをおこなった。泳動後、セミドライ式ブロッティング装置により蛋白質をPVDF膜（ミリポア社製）に転写した。転写用緩衝液は、100mMトリス、192mMグリシン、10%メタノールを用いた。

10 (3) タンパク質を転写したPVDF膜を5%脱脂粉乳含有TBS-T溶液に浸し、室温で1時間振とうした。ついで1%脱脂粉乳含有TBS-T溶液に抗カスパーゼ8抗体（医学生物学研究所社製）を1000分の1（溶媒に対する容量比）加えた溶液に浸し、4℃で一晩反応させた。PVDF膜を
15 TBS-T溶液で10分間3回洗浄後、TBS-T溶液にHRP標識抗マウスIgG抗体（アマシャムファルマシア社製）を1000分の1（溶媒に対する容量比）加えた溶液に浸し、室温で1時間反応させた。TBS-T溶液で10分間3回洗浄後、検出試薬（ECLシステム：アマシャムファルマシア社製）に浸し、X線フィルムに露光させた。

20 NIH Imageソフトによりカスパーゼ8/a、カスパーゼ8/bのバンドの濃度を数値化し、PMA、PHA刺激下の値を未刺激下の値で除した相対値で結果を示した。結果を平均値±標準偏差として以下に示す。

健常者 : 0.72±0.19

RA患者 : 1.33±0.23

細胞の刺激により健常者においては、カスパーゼ 8 (カスパーゼ 8/a、カスパーゼ 8/b) の減少、すなわち分解が観察されるのに対して、RA 患者においてはカスパーゼ 8 の分解が観察されなかった。

実施例 10 正常型 DR 3 を補完することによる細胞死の誘導

5 (1) 正常型 DR 3 発現ベクターの構築

参考例 1 の (4) で得た配列番号 2 の位置 21~1342 がクローン化されたプラスミド 2 μ g に BamH I (宝酒造社製) 5unit、Xba I (宝酒造社製) 5unit、10xK 緩衝液 (宝酒造社製) 1.25 μ l を加え、滅菌蒸留水で全量を 25 μ l にした。この反応液を 37°C で 4 時間保温後、分子量マーカー (1kbp ladder: フェルメンタス社製) と共にアガロースゲル (1% Agarose S: ニッポンジーン社製) にて TAE 緩衝液中で電気泳動した。約 1.3kbp の DNA バンドをゲルから回収し、市販キット (QIAquick Gel Extraction Kit: キアゲン社製) により精製した。

15 (2) pcDNA3.1 (商品名: インビトロジェン社製) 2 μ g に BamH I (宝酒造社製) 5unit、Xba I (宝酒造社製) 5unit、10xK 緩衝液 (宝酒造社製) 1.25 μ l を加え、滅菌蒸留水で全量を 25 μ l にした。この反応液を 37°C で 4 時間保温後、分子量マーカー (1kbp ladder: フェルメンタス社製) と共にアガロースゲル (1% Agarose S: ニッポンジーン社製) にて TAE 緩衝液中で電気泳動した。5.6kbp の DNA バンドをゲルから
20 回収し、市販キット (QIAquick Gel Extraction Kit: キアゲン社製) により精製した。

(3) 実施例 10 (1) で精製した DNA 断片 30ng と実施例 10 (2) で精製した pcDNA3.1 ベクター 30ng を T4DNA リガーゼ溶液 (DNA ligation kit Ver. II の solution I: 宝酒造社製) と 4 μ l と混合し、16°C で 2 時

間ライゲーションをおこなった。

(4) 実施例2に記載の方法と同様にしてプラスミドDNAを調製し、配列番号2の位置21~1342が組み換えられた正常型DR3発現ベクターを構築した。

5 (5) 変異型DR3発現ベクターの構築

参考例1(17)で得た配列番号3の位置564にAからGの変異を有する配列番号4の位置21~731がクローン化されたプラスミド2 μ gにEcoRI(宝酒造社製)5unit、HindIII(宝酒造社製)5unit、10xM緩衝液(宝酒造社製)4 μ lを加え、滅菌蒸留水で全量を40 μ lにした。この反応液を37℃で4時間保温後、分子量マーカー(100 bp ladder: ニューイングランドバイオラボ(NEB)社製)と共にアガロースゲル(1% Agarose S: ニッポンジーン社製)にてTAE緩衝液中で電気泳動した。約0.8kbpのDNAバンドをゲルから回収し、市販キット(QIAquick Gel Extraction Kit: キアゲン社製)により精製した。

15 (6) pcDNA3.1/V5-His(商品名: インビトロジェン社製)2 μ gを実施例10の(5)と同様にしてEcoRIおよびHindIIIにより消化し、5.5kbpのDNAバンドをゲルから回収し、市販キット(QIAquick Gel Extraction Kit: キアゲン社製)により精製した。

20 (7) 実施例10の(5)で精製したDNA断片30ngと実施例10の(6)で精製したpcDNA3.1/V5-Hisベクター30ngをT4DNAリガーゼ溶液(DNA ligation kit Ver IIのsolution I: 宝酒造社製)と4 μ lと混合し、16℃で2時間ライゲーションをおこなった。

(8) 実施例2に記載の方法と同様にしてプラスミドDNAを調製し、配列番号3の位置564にAからGの変異を有する配列番号4の位置21

～731 が組み換えられた変異型発現ベクターを構築した。

(9) 正常型、変異型 DR 3 発現ベクター $4\mu\text{g}$ を pRL-TK (商品名: プロメガ社製) ベクター $1\mu\text{g}$ とともに、実施例 4 (6) と同様にしてジャーカット (Jurkat) 細胞にトランスフェクションした。なお、ベクターの全量はコントロールベクター (pcDNA3.1、商品名: インビトロジェン社製) により $11\mu\text{g}$ とした。電気ショック後、氷冷下に 10 分間静置し、RPMI1640/10%FCS で全量を 4ml とし、6 ウェルプレートで 37°C 、5% CO_2 で 24 時間培養した。細胞を回収しリン酸緩衝食塩水で洗浄後、 $100\mu\text{l}$ の細胞溶解液 (Passive Lysis Buffer: プロメガ社製) に可溶化した。この溶液 $20\mu\text{l}$ とルシフェラーゼ基質 $50\mu\text{l}$ (Stop & Glo 基質: プロメガ社製) を混合し、ルミノメーター (Luminoskan: 大日本製薬社製) を用いて発光量を測定した。

pRL-TK ベクターが導入された細胞ではルシフェラーゼ遺伝子が翻訳されるため、その細胞溶解液は化学発光を呈する。一方、DR 3 の発現によりアポトーシスが誘導されると、細胞数の減少により発光量が低下すると考えられる。すなわちこの試験は、細胞死の誘導を発光量を指標として検出するものである。

コントロールベクター (pcDNA3.1) を導入した細胞溶解液の発光量を 100 とし、各ベクターを導入した細胞溶解液の発光量を相対値で示した。結果は以下のとおりである。

正常型 DR 3 : 11.1

変異型 DR 3 : 101.7

正常型 DR 3 + 変異型 DR 3 : 10.3

変異型 DR 3 を導入した細胞の発光量はコントロールとほぼ同等の値

を示した。すなわち、この細胞にはアポトーシスが誘導されないのに対して、正常型DR3と変異型DR3を等量導入した細胞の発光量は、正常型DR3のみを導入した細胞と同様低値を示し、細胞死が誘導された。このように正常型DR3の補完はRAの治療法として有用であると考えられる。

尚、発明を実施するための最良の形態の項においてなした具体的な実施態様または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する特許請求の範囲内で、いろいろと変更して実施することができるものである。

産業上の利用の可能性

本発明は、変異を有するゲノム、タンパク質、それらの変異を利用したヒト慢性関節リウマチの診断方法（換言すれば、発症または発症可能性の判定方法）、上記変異検出用の診断（判定）キット、当該リウマチの治療方法および治療薬剤に関する。本発明によれば、慢性関節リウマチの発病またはその発症可能性を高精度に簡便かつ確実に行うことができ、有用である。さらに、本発明は、慢性関節リウマチの新たな予防法、治療法および治療薬剤としても有用である。

請 求 の 範 囲

1. 配列番号1のゲノムにおいて、下記の変異：

(1) 位置921の塩基がシトシン(C)からチミン(T)への置換

5 (2) 位置1755の塩基がアデニン(A)からグアニン(G)への置換

(3) 位置2443～2456の塩基の欠損

(4) 位置2531の塩基がシトシン(C)からチミン(T)への置換

(5) 位置2678の塩基がアデニン(A)からチミン(T)への置換

(6) 位置2826の塩基がアデニン(A)からグアニン(G)への置換

10 の1以上を有することを特徴とする慢性関節リウマチに關与するゲノム。

2. 配列番号3のアミノ酸配列からなるタンパク質において、位置159のアスパラギン酸からグリシンへの変異を有するタンパク質。

3. 請求の範囲第1項記載のゲノムを検出することを特徴とする慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性の判定方法。

15 4. 請求の範囲第1項記載のゲノムの転写産物を検出することを特徴とする慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性の判定方法。

5. ゲノムの転写産物がタンパク質である請求の範囲第4項記載の慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性の判定方法。

20 6. 請求の範囲第1項に記載のゲノム、それらの転写産物またはそれらの変異を検出する方法を利用した慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性の判定キット。

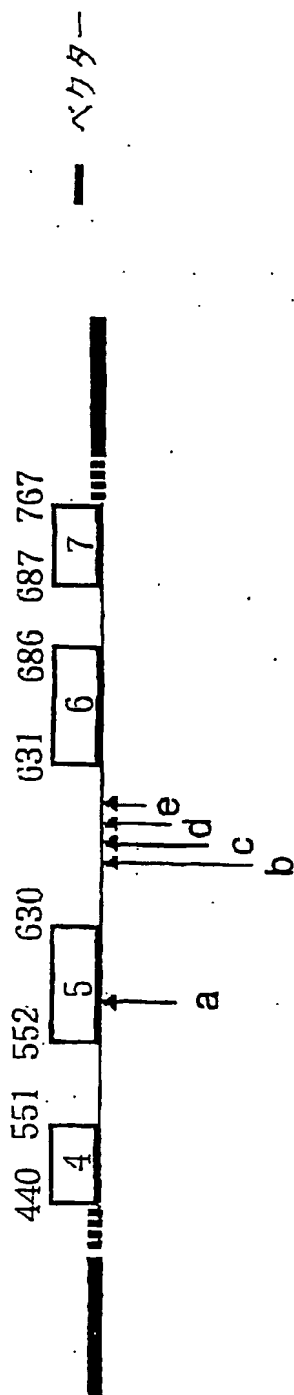
7. 請求の範囲第1項記載のゲノムの転写産物である変異型タンパク質を持つ慢性関節リウマチ患者に、その変異を持たない正常型タンパク質または当該正常型タンパク質をコードするDNA、あるいは、このレセ

プタータンパク質のアゴニストとしての低分子化合物を補完することを特徴とする慢性関節リウマチの治療方法。

8. 請求の範囲第1項記載のゲノムの転写産物である変異型タンパク質を持つ慢性関節リウマチ患者の治療に用いられる治療薬剤であって、その変異を持たない正常型タンパク質または当該正常型タンパク質をコードするDNA、あるいは、このレセプタータンパク質のアゴニストとしての低分子化合物を主成分とする慢性関節リウマチの治療薬剤。
- 5

1 / 5

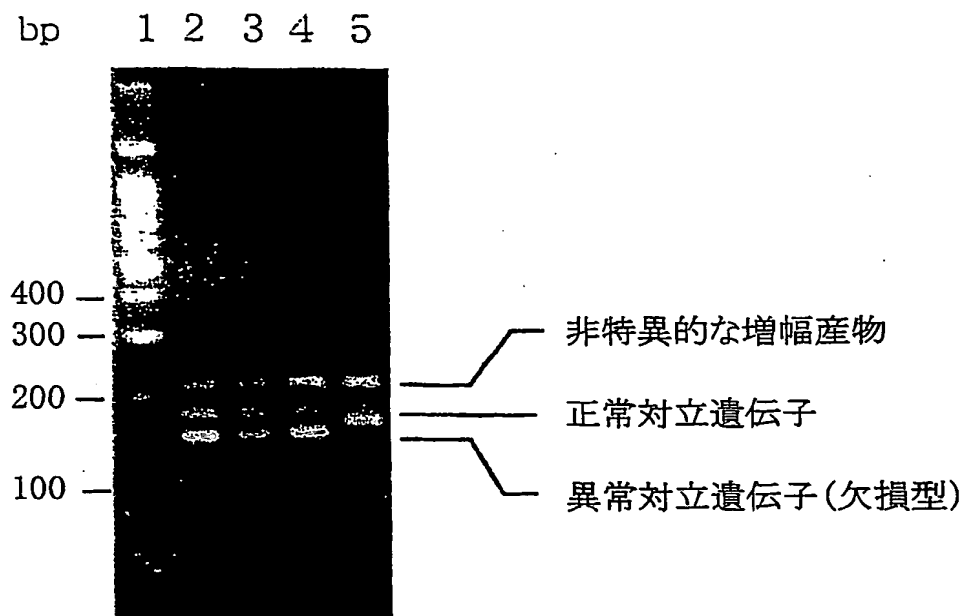
図 1



- a: 配列番号1の1755の変異部位
- b: 配列番号1の2443-2456の欠損部位
- c: 配列番号1の2531の変異部位
- d: 配列番号1の2678の変異部位
- e: 配列番号1の2826の変異部位

2 / 5

図 2



lane 1 : 100bp ladder

lane 2-4 : 変異をもつゲノムから増幅されたPCR産物

lane 5 : 正常ゲノムから増幅されたPCR産物

図 3

変異 — 全部



3 / 5

図 4

変異

-

a

c

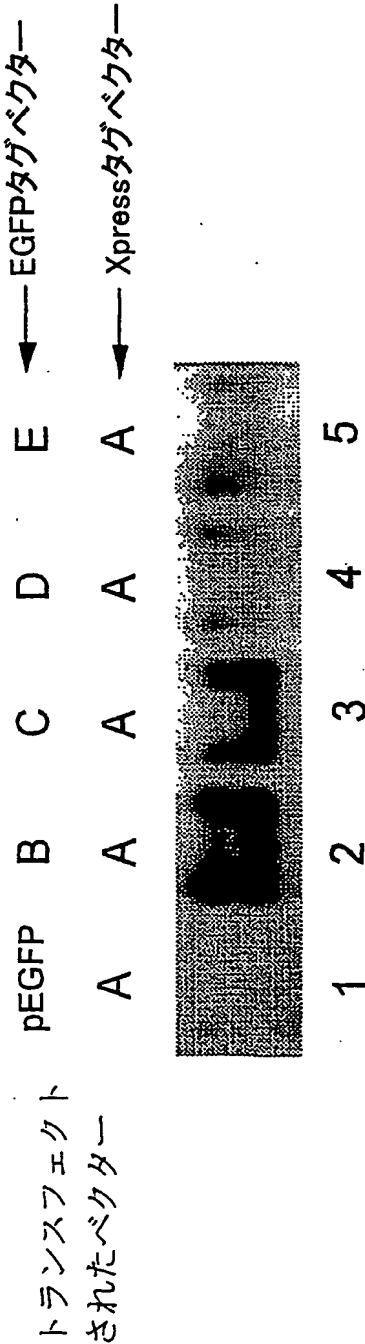
d

e

全部

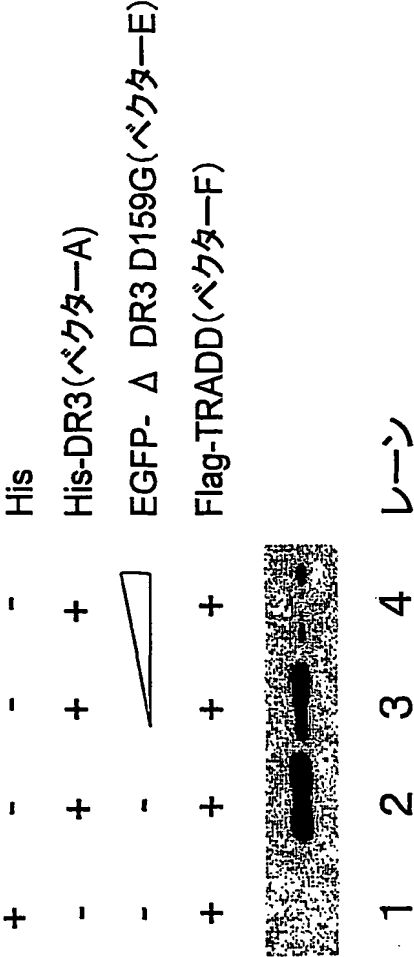


図5



5 / 5

図 6



SEQUENCE LISTING

<110> 塩澤 俊一

Shiozawa, Shunichi

<120> 慢性関節リウマチに関与するゲノム、その診断方法、その発症可能性の判定方法、それらの検出用診断キットおよび、慢性関節リウマチの治療方法ならびに治療薬剤

Genome responsible for chronic rheumatoid arthritis, diagnostic method, pathogenicity judging method and detection-use diagnostic kit of chronic rheumatoid arthritis, and therapeutic method and medicine of chronic rheumatoid arthritis

<130> TLOP1-2

<140>

<141>

<150> JP 2000-324296

<151> 2000-10-24

<150> JP 2001-90546

<151> 2001-3-27

<150> JP 2001-99990

<151> 2001-3-30

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4825

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> intron

<222> (128).. (635)

<220>

<221> intron

<222> (757).. (973)

<220>

<221> intron

<222> (1109).. (1476)

<220>

<221> intron

<222> (1645).. (1742)

<220>

<221> intron

<222> (1822).. (3068)

<220>

<221> intron

<222> (3125).. (3225)

<220>

<221> intron

<222> (3334).. (3529)

<220>

<221> intron

<222> (3578).. (4021)

<220>

<221> intron

<222> (4203).. (4433)

<400> 1

```

cgggcccigc gggcgcgggg ctgaaggcgg aaccacgacg ggcagagagc acggagccgg 60
gaagccccctg ggcgcccgc ggaggcgctat ggagcagcgg ccgcggggct gcgcggcgg 120
ggcggcggtg agttagacg caggaggcga ggggcagctt tgagcccgt cccaagagcc 180
tcggtagaagg aaggggcccc gggcgcgctt ccacccaag cctcacggg ggcggggtg 240
ggcggccctt cgcactcgt taaaggcctc tccaggcggt agcccttcca ctgagaggaa 300
acccctccca gggggctctg gggggcccg gcagagcatt atcagtgtcc ctccccaac 360
agaaagcalt ggtgggggtg gggcgcgctg tggatctctg ctctgggtga ggggaaact 420
gtgaggggct ggttagcgcc ccttcgaag ctgggtgtgt gcgcggggg aaggaagta 480
gtttctctc caccatggg cacccttct gcccggggc tgggaagtg gcgtctctg 540
gggcaaalgc tggggctct gaaatggagg agacgcagca ggcagaggcc ccacgtggg 600
agctgcgtg agatcagca gcacctgtcc cccaggcgct cctctgggt ctgctgggg 660
cccgggccc gggcggcact cgtagcccca gggtgactg tggcggtgac tccacaaga 720
agattggct gtttgtgtc agaggctgcc cagcgggtaa gtggccacag ggggggaga 780
ggcatggggc aggcagggt ggagagggtg cgggcaggcc cgggaggtaa gaggaggct 840
gcaggggagg tagggtagg ctgacagaga agtagggagc tggagagaaa gagggagga 900
gggcagggtg gnaagcaggt cgggggttgc tgggcagccc ctctgctgc ctgacccctg 960
ccgggttcca cagggcacta cctgaaggcc ccttgacgg agccctgcgg caactccacc 1020
tgcttgtgt gtcccaaga cacttcttg gccgggaga accaccataa ttctgaagt 1080
ggcgcgtgcc aggcctgtg tagcagggt gaggggctt cagtgtctg gcaggagat 1140
cctaaggaca ggccttctg aaggaagtg ctggctggg cccaacttg ggtgtgagg 1200
gtccgtgacc caccctgtc agaaccctc accctgatc tcttcaggg tggcctgtc 1260
ccttctctt tctgggtgac ctcccatct ctccatgtc ctggccctt ggtcggtct 1320
aatctctgag ctctctctt tttagggta gccctgtacc tgtctgtct tgcctattt 1380
ctgtctccat taatggga taatgctct gccttccat gggagcctt ggccctgact 1440
aactctccac tccccatct cctgcacccc caccagctc ccagggtggc ctggagaact 1500
gttcagcagt ggcggacacc cgtgtggct gtaagccagg ctggttgtg ggtgtcagg 1560
tcagccaatg ttcagcagt tacccttct atcgcaacc atgcttagac tggggggccc 1620
tgcaccgcca cacacggcta ctctgtagt accccaccc agggctctt actccagac 1680
cccccttcc ctgctgacc cactcctgt ccatgggtg gcatgctct ctggatgtc 1740
aggctccgc agagatact actgtgggac ctgctgtct ggccttctg aacatggga 1800
tggctgcgt tctgccccca cgtaatctt agctgtctg ggaaggagg aaggcggt 1860
gggagcagag caggggctg ggtggggca ggtgtgtg gticaggaat aggaagagg 1920

```

gatagggagg agggagccctt ggcccigtga lgggtgggcc ccacttcagg caaactiaga 1980
lggcaaaaga gcaatcigga lccgccttag ccagatacat aagggtatit gccitcacit 2040
tcagccagca tccccccag cgaicctagc cagatallac agatgatitg tcacttacac 2100
agagagtcac attgalatag cttaaaaaci lgggtgaag gaggttgagg ctgcagttag 2160
clalgalcgt gccactgcac ttcagccigg gcaacagagc gagacctait aaalaaataa 2220
ataaataaia aatctattaa atattaaata ttaaactiat taaataaata aatacaagg 2280
gcigagagtc aggaactgic tgcitgctt claggggalc tgggcaagt gcagagaati 2340
cgctctctg atgigtggg tcccttctc aacalggga gttagcagc aaitcacagg 2400
cctilgalca gaggtaagg acitctgtga gctatcaag tcttttttt ttttttttt 2460
ttttttttt gagatggaga ctgctctgt caccaggtt ggagtgtagt ggcacgaict 2520
tggctacta caacctctg tgcctgggt caagtattc tctgccica gcctccaag 2580
tagctgggac lacaggagcc caccaccacc cccggctaai ttttgtatt tttaglagag 2640
acggggltc accgtgllag ccaagalgt ctgaltacc tgacctctg atccaccgc 2700
ctggcctcc caaagtctg ggaattacagg calgagccac cgcggccggc ctccattcaa 2760
gicittatig aatctctgt atgtctaca cactgttcta gglctgggg atgcaacagg 2820
ggacaaaia ggcaaaatcc ctgtcttiti ggggttgaca ttctagtac tctcatgta 2880
gtctagaaga agctcagiga atagtctct tggltgttac caggacaca atgacaggaa 2940
catcttggg tagagtgaga ggctgggga ggaagggtc tctaggatgg agcagatgct 3000
gggcagctit agggagcccc lcciggaig cacccttca tccctcaggc caccctctc 3060
ccttgaggga gcaccttggg gacgtgtcca gagcgtgtg ccgtgtctg lggctggagg 3120
cagagtaggt ggigtgtgg gaatgcgagt gggagaactg ggaaggacc aggggaggcg 3180
ggtgaggagg ggggcaacca cccaacacc accagctgt ttcagigtic tgggtccagg 3240
tgtcttggc tggcttctg gtcccttcc tgcctgggg caccctgacc tacacatacc 3300
gccactgtc gccctacaag cccctggta ctggttaagta cacacacca cacacgacc 3360
cagaagcctg gggcaggat gggtagcca gagcttctc aacctgata cagaaggga 3420
aaclgaggca gggagtgtg ggtgcagagg aaccttagag gacgtgtacc agcaccagg 3480
lccaggaggc ttgctggig gctgaccga atctctgt gtcgtcagc agatgaagct 3540
ggatggagg ctctgacccc accaccggt agaaccacac tgtgtgattc lgggtgcct 3600
tctggagctg gaagatcaag ccttactatg atccctggag ctggcacgc ggcagcacc 3660
ggtagccct agtggacaga ggtgtggga gcagagtcag cagtggatga gaccagcaca 3720
gtgctgccc tcaaggggt ctgagtcagc tggagttagc atctgtacac aggagctaac 3780
agltcaatgg aaggagagcc caatgggtgt ggggacaag aggaaggagg cggggcagg 3840
ggactcaagg cagaagcaag agtctgtg ggtacagt agagcagggc caactgtgg 3900
agggtcatt gcgggggtgt ctgtgacg aaccaggac tgtccctcc tggagaggca 3960
ctggggtaa gggcccttac ttggcaagca ggcctgacct ggggccccctc ttggctcca 4020
ggccacccat ctgtacccct tggacagcgc ccacacctt ctgacacctc ctgacagcag 4080

5/17

tgagaagatc tgcaccgtcc agttgggtggg laacagctgg acccctggct accccgagac 4140
 ccaggaggcg ctctgcccgc aggtgacatg gtcctggggac cagtggccca gcagagctct 4200
 lgglaaggga catcaglggc ctgaggccctt gaccccalic tccigtctgc ggtgggaagl 4260
 tgggtttca caacglgtc cclttctgcc cctaaciga cggagtcgc cctatgccct 4320
 gaccacccgg atccagcggg ctccagcccl ggggtaccgg cacgaacgcc cctgactctg 4380
 cctcccgacc gcggcccacg taccccaall ggcctctctt ggccctggcc caggccccgc 4440
 tgcctgcgcc acactctgc cagagtcgcc agccggctcg ccagccaiga tgcctcagcc 4500
 gggcccgcat ctctacgacg tgatggacgt ggtcccgacg cggcgctgga aggagttct 4560
 gcgcacgctg gggctgcgcg aggcagagat cgaagccgtg gaggaggaga tggccgctt 4620
 ccgagaccag cagtacgaga tgcacaagcg ctggcgccag cagcagcccg cgggccctcg 4680
 agccgtttac gcggccctgg agcgcatggg gcggacggc tgcgtggaag acttgccag 4740
 ccgcttcag cgcggcccg tgcacggcg ccacttgcca cctaggcgt ctgggtggcc 4800
 ttgcagaagc cctaagtcg gtac 4825

<210> 2

<211> 1634

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (89).. (1342)

<400> 2

cgggccctgc gggcgccggg ctgaaggcgg aaccacgacg ggcagagagc acggagccgg 60
 gaagccccctg ggcgcccgtc ggaggcct atg gag cag cgg ccg cgg ggc tgc 112
 Met Glu Gln Arg Pro Arg Gly Cys
 1 5
 gcg gcg gtg gcg gcg gcg ctc ctc ctg gtg ctg ctg ggg gcc cgg gcc 160
 Ala Ala Val Ala Ala Ala Leu Leu Leu Val Leu Leu Gly Ala Arg Ala
 10 15 20
 cag ggc ggc act cgt agc ccc agg tgt gac tgt gcc ggt gac ttc cac 208
 Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His
 25 30 35 40
 aag aag att ggt ctg ttt tgt tgc aga ggc tgc cca gcg ggg cac tac 256

Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr
 45 50 55
 ctg aag gcc cct tgc acg gag ccc tgc ggc aac tcc acc tgc ctt gtc 304
 Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val
 60 65 70
 tgt ccc caa gac acc ttc ttg gcc tgg gag aac cac cat aat tct gaa 352
 Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu
 75 80 85
 tgt gcc cgc tgc cag gcc tgt gat gag cag gcc tcc cag gtg gcg ctg 400
 Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu
 90 95 100
 gag aac tgt tca gca gtg gcc gac acc cgc tgt ggc tgt aag cca ggc 448
 Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly
 105 110 115 120
 tgg ttt gtg gag tgc cag gtc agc caa tgt gtc agc agt tca ccc ttc 496
 Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser Gln Cys Val Ser Ser Ser Pro Phe
 125 130 135
 tac tgc caa cca tgc cta gac tgc ggg gcc ctg cac cgc cac aca cgg 544
 Tyr Cys Gln Pro Cys Leu Asp Cys Gly Ala Leu His Arg His Thr Arg
 140 145 150
 cta ctc tgt tcc cgc aga gat act gac tgt ggg acc tgc ctg cct ggc 592
 Leu Leu Cys Ser Arg Arg Asp Thr Asp Cys Gly Thr Cys Leu Pro Gly
 155 160 165
 ttc tal gaa cat ggc gat ggc tgc gtg tcc tgc ccc acg agc acc ctg 640
 Phe Tyr Glu His Gly Asp Gly Cys Val Ser Cys Pro Thr Ser Thr Leu
 170 175 180
 ggg agc tgt cca gag cgc tgt gcc gct gtc tgt ggc tgg agg cag atg 688
 Gly Ser Cys Pro Glu Arg Cys Ala Ala Val Cys Gly Trp Arg Gln Met
 185 190 195 200
 ttc tgg gtc cag gtg ctc ctg gct ggc ctt gtg gtc ccc ctc ctg ctt 736
 Phe Trp Val Gln Val Leu Leu Ala Gly Leu Val Val Pro Leu Leu Leu
 205 210 215
 ggg gcc acc ctg acc tac aca tac cgc cac tgc tgg cct cac aag ccc 784
 Gly Ala Thr Leu Thr Tyr Thr Tyr Arg His Cys Trp Pro His Lys Pro
 220 225 230
 ctg gtt act gca gat gaa gct ggg atg gag gct ctg acc cca cca ccg 832

Leu Val Thr Ala Asp Glu Ala Gly Met Glu Ala Leu Thr Pro Pro Pro
 235 240 245
 gcc acc cal clg tca ccc ttg gac agc gcc cac acc cti cia gca cci 880
 Ala Thr His Leu Ser Pro Leu Asp Ser Ala His Thr Leu Leu Ala Pro
 250 255 260
 cct gac agc agt gag aag atc tgc acc gtc cag ttg gtg ggt aac agc 928
 Pro Asp Ser Ser Glu Lys Ile Cys Thr Val Gln Leu Val Gly Asn Ser
 265 270 275 280
 tgg acc cct ggc tac ccc gag acc cag gag gcg ctc tgc ccg cag gtg 976
 Trp Thr Pro Gly Tyr Pro Glu Thr Gln Glu Ala Leu Cys Pro Gln Val
 285 290 295
 aca tgg tcc tgg gac cag ttg ccc agc aga gct cti ggc ccc gct gct 1024
 Thr Trp Ser Trp Asp Gln Leu Pro Ser Arg Ala Leu Gly Pro Ala Ala
 300 305 310
 gcg ccc aca ctc tgc cca gag tcc cca gcc ggc tgc cca gcc atg atg 1072
 Ala Pro Thr Leu Ser Pro Glu Ser Pro Ala Gly Ser Pro Ala Met Met
 315 320 325
 clg cag ccg ggc ccg cag ctc tac gac gtg atg gac gcg gtc cca gcg 1120
 Leu Gln Pro Gly Pro Gln Leu Tyr Asp Val Met Asp Ala Val Pro Ala
 330 335 340
 cgg cgc tgg aag gag ttc gtg cgc acg ctg ggg ctg cgc gag gca gag 1168
 Arg Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala Glu
 345 350 355 360
 atc gaa gcc gtg gag gtg gag atc ggc cgc ttc cga gac cag cag tac 1216
 Ile Glu Ala Val Glu Val Glu Ile Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln Tyr
 365 370 375
 gag atg ctc aag cgc tgg cgc cag cag cag ccc gcg ggc ctc gga gcc 1264
 Glu Met Leu Lys Arg Trp Arg Gln Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly Ala
 380 385 390
 gtt tac gcg gcc ctg gag cgc atg ggg ctg gac ggc tgc gtg gaa gac 1312
 Val Tyr Ala Ala Leu Glu Arg Met Gly Leu Asp Gly Cys Val Glu Asp
 395 400 405
 ttg cgc agc cgc ctg cag cgc ggc ccg tga caggcgccc acttgccacc 1362
 Leu Arg Ser Arg Leu Gln Arg Gly Pro
 410 415
 taggcgctct ggtagccctt gcagaagccc taagtacggt tacttatgcg ttagacatt 1422

ttatgtcact tattaagccg ctggcacggc cctgcgtagc agcaccagcc ggccccaccc 1482
 ctgctcgccc clatcgctcc agccaaggcg aagaagcacg aacgaatgic gagagggggt 1542
 gaagacattt ctaacttct cggccggagt tiggctgaga tcgcgggtat aaatcigtga 1602
 aagaaaacaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1634

<210> 3

<211> 417

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Glu Gln Arg Pro Arg Gly Cys Ala Ala Val Ala Ala Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Leu Leu Gly Ala Arg Ala Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg
 20 25 30
 Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys
 35 40 45
 Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro
 50 55 60
 Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala
 65 70 75 80
 Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp
 85 90 95
 Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp
 100 105 110
 Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser
 115 120 125
 Gln Cys Val Ser Ser Ser Pro Phe Tyr Cys Gln Pro Cys Leu Asp Cys
 130 135 140
 Gly Ala Leu His Arg His Thr Arg Leu Leu Cys Ser Arg Arg Asp Thr
 145 150 155 160
 Asp Cys Gly Thr Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Glu His Gly Asp Gly Cys
 165 170 175
 Val Ser Cys Pro Thr Ser Thr Leu Gly Ser Cys Pro Glu Arg Cys Ala
 180 185 190

9/17

Ala Val Cys Gly Trp Arg Gln Met Phe Trp Val Gln Val Leu Leu Ala
 195 200 205
 Gly Leu Val Val Pro Leu Leu Leu Gly Ala Thr Leu Thr Tyr Thr Tyr
 210 215 220
 Arg His Cys Trp Pro His Lys Pro Leu Val Thr Ala Asp Glu Ala Gly
 225 230 235 240
 Met Glu Ala Leu Thr Pro Pro Pro Ala Thr His Leu Ser Pro Leu Asp
 245 250 255
 Ser Ala His Thr Leu Leu Ala Pro Pro Asp Ser Ser Glu Lys Ile Cys
 260 265 270
 Thr Val Gln Leu Val Gly Asn Ser Trp Thr Pro Gly Tyr Pro Glu Thr
 275 280 285
 Gln Glu Ala Leu Cys Pro Gln Val Thr Trp Ser Trp Asp Gln Leu Pro
 290 295 300
 Ser Arg Ala Leu Gly Pro Ala Ala Ala Pro Thr Leu Ser Pro Glu Ser
 305 310 315 320
 Pro Ala Gly Ser Pro Ala Met Met Leu Gln Pro Gly Pro Gln Leu Tyr
 325 330 335
 Asp Val Met Asp Ala Val Pro Ala Arg Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg
 340 345 350
 Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala Glu Ile Glu Ala Val Glu Val Glu Ile
 355 360 365
 Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln Tyr Glu Met Leu Lys Arg Trp Arg Gln
 370 375 380
 Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly Ala Val Tyr Ala Ala Leu Glu Arg Met
 385 390 395 400
 Gly Leu Asp Gly Cys Val Glu Asp Leu Arg Ser Arg Leu Gln Arg Gly
 405 410 415
 Pro

<210> 4

<211> 787

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10/17

<220>

<221> CDS

<222> (89).. (655)

<400> 4

```

cgggccctgc gggcgccggg ctgaaggcgg aaccacgacg ggcagagagc acggagccgg 60
gaagccccctg ggcgcccgtc ggaggggt atg gag cag cgg ccg cgg ggc tgc 112
                               Met Glu Gln Arg Pro Arg Gly Cys
                               1           5
gcg gcg gtg gcg gcg gcg ctc ctc ctg glg ctg ctg ggg gcc cgg gcc 160
Ala Ala Val Ala Ala Ala Leu Leu Leu Val Leu Leu Gly Ala Arg Ala
    10           15           20
cag ggc ggc act cgt agc ccc agg tgt gac tgt gcc ggt gac ttc cac 208
Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His
    25           30           35           40
aag aag att ggt ctg ttt tgt tgc aga ggc tgc cca gcg ggg cac tac 256
Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr
           45           50           55
ctg aag gcc cct tgc acg gag ccc tgc ggc aac tcc acc tgc ctt glg 304
Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val
           60           65           70
tgt ccc caa gac acc ttc ttg gcc tgg gag aac cac cat aat tct gaa 352
Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu
           75           80           85
tgt gcc cgc tgc cag gcc tgt gat gag cag gcc tcc cag gtg gcg ctg 400
Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu
           90           95          100
gag aac tgt tca gca gtg gcc gac acc cgc tgt ggc tgt aag cca ggc 448
Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly
    105           110           115           120
tgg ttt gtg gag tgc cag gtc agc caa tgt gtc agc agt tca ccc ttc 496
Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser Gln Cys Val Ser Ser Ser Pro Phe
           125           130           135
tac tgc caa cca tgc cta gac tgc ggg gcc ctg cac cgc cac aca cgg 544
Tyr Cys Gln Pro Cys Leu Asp Cys Gly Ala Leu His Arg His Thr Arg
           140           145           150

```

11/17

cta ctc tgt tcc cgc aga gat act gac tgt ggg acc tgc ctg cct ggc 592
 Leu Leu Cys Ser Arg Arg Asp Thr Asp Cys Gly Thr Cys Leu Pro Gly
 155 160 165
 ttc tat gaa cat ggc gat ggc tgc gtg tcc tgc ccc act aga gac ggc 640
 Phe Tyr Glu His Gly Asp Gly Cys Val Ser Cys Pro Thr Arg Asp Gly
 170 175 180
 gtt tca ccg tgt tag ccaagaaggc ctgtatcacc tgacctgtg atccaccgc 695
 Val Ser Pro Cys
 185
 ctggccctcc caaagtgctg ggattacagg catgagccac cgcgcccggc ctccattcaa 755
 gtctttatig aatatcigt atgttctaca ca 787

<210> 5

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Glu Gln Arg Pro Arg Gly Cys Ala Ala Val Ala Ala Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Leu Leu Gly Ala Arg Ala Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg
 20 25 30
 Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys
 35 40 45
 Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro
 50 55 60
 Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala
 65 70 75 80
 Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp
 85 90 95
 Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp
 100 105 110
 Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser
 115 120 125
 Gln Cys Val Ser Ser Ser Pro Phe Tyr Cys Gln Pro Cys Leu Asp Cys

12/17

130 135 140
 Gly Ala Leu His Arg His Thr Arg Leu Leu Cys Ser Arg Arg Asp Thr
 145 150 155 160
 Asp Cys Gly Thr Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Glu His Gly Asp Gly Cys
 165 170 175
 Val Ser Cys Pro Thr Arg Asp Gly Val Ser Pro Cys
 180 185

<210> 6

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 6

ggggtaccat ccgttcctg cccagccag gctggttgt ggagtc

47

<210> 7

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 7

ccgctcgagg ggccaccacc agtccagtg gcggaatgt taggcagg

49

<210> 8

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 8

atccgcttcc tgcgcc

16

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 9

ggggccacct ccagtgcc

18

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 10

egttcccgca gaggtactga ctgiggga

28

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

14/17

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 11

tcccacagtc agtacctctg cgggaacc

28

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 12

cttggctcac tataacctct gctgcctggg

30

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 13

cccaggcagc agaggttata glgagccaag

30

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

15/17

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 14

gatggctcgg atctcctgac ctctgatcc

30

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 15

ggatcacgag gtcaggagat caagaccatc

30

<210> 16

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 16

gcaacagggg acagaatagg caaatccct g

31

<210> 17

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 17

cagggalltt gcctattcig lccctgttg c

31

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 18

tgltcccgca gaggtactga ctgiggga

28

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 19

lccacagtc agtacctctg cgggaaca

28

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

17/17

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 20

cgaggcggcc aggaggig

18

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 21

ggttcagcaa tagccgcaga

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09313

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C07K 14/47, C12Q 1/68, G01N 33/50, A61K 38/17, A61K 48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C07K 14/47, C12Q 1/68, G01N 33/50, A61K 38/17, A61K 48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
JICST FILE (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| P, X | Shunichi SHIOZAWA, et al., Shikkan Idenshi kara mita Mansei Kansetsu Rheumatism (RA) no Byoutai to Chiryō, Nippon Seikei Geka Gakkai Zasshi, 25 February, 2001 (25.02.01), Vol.75, No.2, p.S15 | 1-6, 8 |
| P, X | Kouichi Murayama, et al., Mansei Kansetsu Rheumatism (RA) no Shikkan Idenshi Death Receptor 3 (DR3) Heni no Doutei, Rheumatism 17 April, 2001 (04.17.2001), Vol.41, No.2, p.509 | 1-6, 8 |
| P, X | Shunichi SHIOZAWA, et al., Mansei Kansetsu Rheumatism (RA) no Shikkan Idenshi, Rheumatism 17 April, 2001 (04.17.2001), Vol.41, No.2, p.335 | 1-6, 8 |
| P, X | Shunichi SHIOZAWA, et al., Mansei Kansetsu Rheumatism to Shikkan Idenshi, Saishin Igaku 10 April, 2001 (04.10.2001), Vol.56, No.4, pp.833-844 | 1-6, 8 |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 January, 2002 (29.01.02)

Date of mailing of the international search report
12 February, 2002 (12.02.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09313

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| P, X | Shunichi SHIOZAWA, et al., Mansei Kansetsu Rheumatism to Shikkan Idenshi, 31 August, 2001 (31.08.2001), Vol.41, No.4, pp.763-772 | 1-6, 8 |
| P, Y | WO 01/32921 A2 (Shunichi SHIOZAWA), 10 May, 2001 (10.05.01), & AU 200110530 A | 1-6, 8 |
| A | WO 98/51791 A1 (Shunichi SHIOZAWA), 19 November, 1998 (19.11.1998), & JP 10-549018 A & EP 1008648 A1 & AU 9867486 A & KR 2001012591 A | 1-6, 8 |
| A | SHIOZAWA, S. et al., An approach to identify new genes in autoimmune diseases: lessons from rheumatoid arthritis. Rev. Immunogenet. 25 April, 2000 (25.04.2000), Vol.2, No.1, pp.133-139 | 1-6, 8 |
| A | WO 97/33904 A1 (HUMAN GENOME SCI INC), 18 September, 1997 (18.09.1997), & JP 11-170 A & EP 898576 A1 & US 6153402 A & AU 9711151 A | 1-6, 8 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09313

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 7 pertains to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/12, C07K 14/47, C12Q 1/68, G01N 33/50, A61K 38/17, A61K 48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/12, C07K 14/47, C12Q 1/68, G01N 33/50, A61K 38/17, A61K 48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST771# (JOIS),
GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| P, X | 塩沢 俊一 他, 疾患遺伝子からみた慢性関節リウマチ (RA) の病態 と治療, 日本整形外科学会雑誌 2001. 02. 25, Vol. 75, No. 2, p. S15 | 1-6, 8 |
| P, X | 村山 公一 他, 慢性関節リウマチ (RA) の疾患遺伝子 Death Recept or 3 (DR3) 変異の同定, リウマチ 2001. 04. 17, Vol. 41, No. 2, p. 509 | 1-6, 8 |
| P, X | 塩沢 俊一 他, 慢性関節リウマチ (RA) の疾患遺伝子, リウマチ 2001. 04. 17, Vol. 41, No. 2, p. 335 | 1-6, 8 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 01. 02

国際調査報告の発送日

2002. 02. 02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) 関連すると認められる文献 | | |
|---------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| P, X | 塩沢 俊一 他, 慢性関節リウマチと疾患遺伝子, 最新医学 2001. 04. 10, Vol. 56, No. 4, p. 833-844 | 1-6, 8 |
| P, X | 塩沢 俊一 他, 慢性関節リウマチと疾患遺伝子, リウマチ 2001. 08. 31, Vol. 41, No. 4, p. 763-772 | 1-6, 8 |
| P, Y | WO 01/32921 A2 (塩澤 俊一) 2001. 05. 10 & AU 200110530 A | 1-6, 8 |
| A | WO 98/51791 A1 (塩澤 俊一) 1998. 11. 19 & JP 10-549018 A & EP 1008648 A1 & AU 9867486 A & KR 2001012591 A | 1-6, 8 |
| A | SHIOZAWA, S. et al. An approach to identify new genes in autoimmune diseases: lessons from rheumatoid arthritis. Rev. Immunogenet. 2000. 04. 25, Vol. 2, No. 1, p. 133-139 | 1-6, 8 |
| A | WO 97/33904 A1 (HUMAN GENOME SCI INC) 1997. 09. 18 & JP 11-170 A & EP 898576 A1 & US 6153402 A & AU 9711151 A | 1-6, 8 |

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

請求の範囲7は、人の身体の治療方法に関するものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。